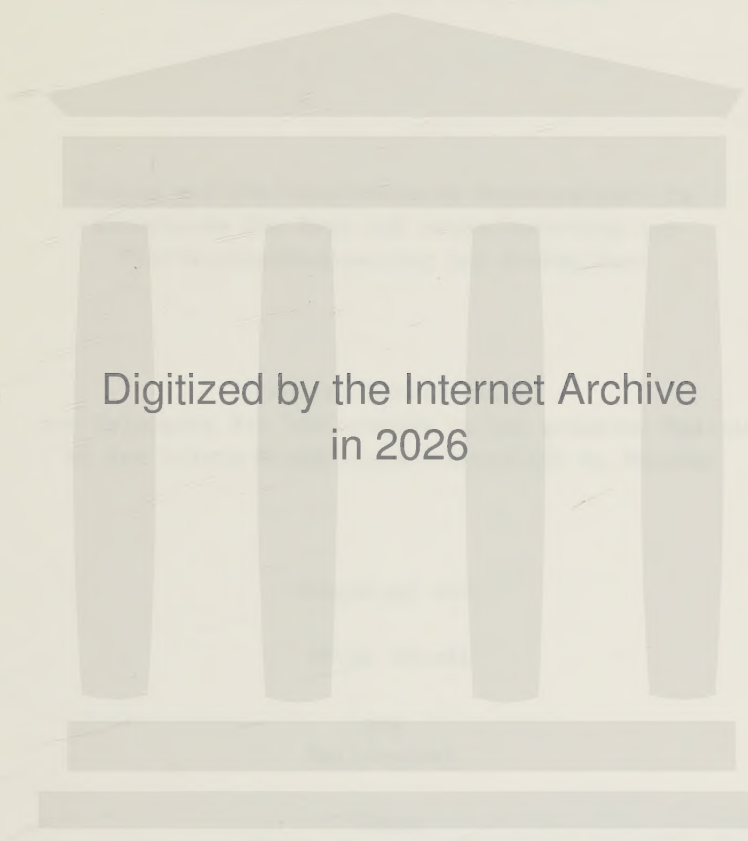


Freies und proteingebundenes  
Fruktoselysin im Blutplasma und Urin  
und seine Bedeutung zur Stoffwechsel-  
überwachung bei Diabetikern

Erich Reindl

*Diss. München*  
*1904*





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Aus der Forschergruppe Diabetes und dem Institut  
für Klinische Chemie am Städtischen Krankenhaus  
München-Schwabing

Direktor: Prof. Dr. O.H. Wieland

Freies und proteingebundenes Fruktoselysin im  
Blutplasma und Urin und seine Bedeutung zur  
Stoffwechselüberwachung bei Diabetikern

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Erich Reindl

aus

Mallersdorf

Jahr

1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. O.H. Wieland

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Februar 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH  
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Diese Arbeit widme ich meiner Mutter



| Inhalt:                                                                                                                 | Seite: |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| A) Einführung                                                                                                           | 1      |
| B) Materialien und Geräte                                                                                               | 5      |
| 1. Materialien                                                                                                          | 5      |
| 2. Geräte                                                                                                               | 6      |
| C) Methoden                                                                                                             | 7      |
| 1. Bestimmung von Furosin                                                                                               | 7      |
| 1.1. Hochdruckflüssigkeitschromatographie                                                                               | 7      |
| 1.2. Proteinfällung und Hydrolyse                                                                                       | 9      |
| 2. Bestimmung von 5-Hydroxymethylfurfural                                                                               | 9      |
| 2.1. Thiobarbitursäurereaktion für HbA <sub>1a-c</sub>                                                                  | 9      |
| 2.2. Thiobarbitursäurereaktion zur<br>Bestimmung nicht fällbarer Aminosäuren<br>und Peptide im Serum und Urin           | 10     |
| 3. Elektrophoretische Trennung und<br>Isolierung von Serumproteinen                                                     | 11     |
| 4. Isolierung von Fruktoselysin aus Serum<br>und Urin                                                                   | 11     |
| 4.1. Isolierung aus Urin                                                                                                | 11     |
| 4.2. Isolierung aus Serum                                                                                               | 14     |
| 5. Präparative Darstellung von nicht=<br>enzymatisch glucosyliertem Humanalbumin<br>für Infusionszwecke                 | 15     |
| 6. Modellversuche zur nichtenzymatischen<br>Glucosylierung von Humanalbumin unter<br>steady-state-Bedingungen, in vitro | 15     |
| D) Ergebnisse und Diskussion                                                                                            | 16     |
| 1. Furosinbestimmung                                                                                                    | 16     |
| 1.1. Proteinfällung                                                                                                     | 16     |
| 1.2. Hydrolyse                                                                                                          | 16     |
| 2. Nichtenzymatische Glucosylierung von<br>Serumproteinen bei Diabetikern und<br>Nichtdiabetikern                       | 18     |
| 2.1. Fruktoselysingehalt in den Protein=<br>fraktionen des Serums bei Diabetikern<br>und Nichtdiabetikern               | 18     |

|                                                                                                                   | Seite: |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 2.2.Vergleich des Diabetikerkollektivs<br>mit dem Nichtdiabetikerkollektiv                                        | 20     |
| 2.3.Befunde bei Störungen in der<br>Konzentration und Zusammensetzung<br>des Plasmaeiweißes                       | 22     |
| 2.3.1.Proteinurien                                                                                                | 22     |
| 2.3.2.Leberfunktionsstörungen                                                                                     | 23     |
| 2.3.3.Plasmozytome                                                                                                | 25     |
| 3. Nichtenzymatische in vitro Gluco=<br>sylierung von menschlichen Serumproteinen                                 | 25     |
| 3.1.Albumin                                                                                                       | 25     |
| 3.2.Gammaglobulin                                                                                                 | 28     |
| 4. Eliminierung von nichtenzymatisch<br>glucosyliertem Humanalbumin aus<br>dem Blutkreislauf                      | 28     |
| 5. Vorkommen von freiem Fruktoselysin<br>und kleinen, basischen Glycosylpeptiden<br>im Serum und Urin             | 30     |
| 5.1.Urin                                                                                                          | 30     |
| 5.2.Serum                                                                                                         | 33     |
| 5.3.Die Ausscheidung von Fruktoselysin<br>über die Niere                                                          | 33     |
| 6. Nichtenzymatische Glucosylierung von<br>Serumproteinen und Langzeitüberwachung<br>des Diabetes mellitus        | 35     |
| 6.1.Vergleich von Serumprotein und Albumin                                                                        | 35     |
| 6.2.Glucosyliertes Serumprotein als Para=<br>meter der längerfristigen Blutzucker=<br>überwachung bei Diabetikern | 35     |
| 6.3.Vergleich der nichtenzymatischen<br>Glucosylierung des Serumproteins<br>mit dem Blutzuckerspiegel             | 38     |
| 6.4.Vergleich von nichtenzymatisch gluco=<br>syliertem Serumprotein und<br>Hämoglobin HbA <sub>1a-c</sub>         | 40     |

E) Zusammenfassung

Seite:

43

Literaturverzeichnis

46

Lebenslauf



## A) Einführung

Maillard(35) beschrieb erstmals eine chemische Reaktion von Zuckermolekülen mit  $\text{NH}_2$ -Gruppen von freien Aminosäuren, bei der durch Ketoaminbildung ein Addukt aus beiden Reaktionspartnern entsteht. Weiterverfolgt wurde diese Entdeckung in der Futtermitteltechnologie (5,6,18,19,20,21), wo bei Trocknungsprozessen entsprechend glucosylierte Aminosäuren und Proteine gebildet werden. Es war überraschend, daß diese Glucose-Aminosäure-Verbindungen auch im Hämoglobin menschlicher Erythrozyten nachgewiesen werden konnten(1). Diese Erkenntnis gewann umso mehr an Bedeutung, als sich herausstellte, daß Patienten, die an Diabetes mellitus erkrankt waren, einen höheren Gehalt an nichtenzymatisch glucosyliertem Hämoglobin aufweisen als Nichtdiabetiker(23,37). Proteingebundene Glucose fand sich in jüngster Zeit auch in anderen Proteinen und verschiedenen Körpergeweben, wie im Linsenkristallin des Auges(46), im Kollagen der Haut(38,44,47), in der Membran der Erythrozyten(2,36), in den Lipoproteinen des Serums(39), in den Glomerula der Nieren(9) und im Insulin(14), hier allerdings nur nach in vitro Inkubation mit Glucose. Inwieweit der vermehrte Einbau von Glucose in Körperproteine pathophysiologische Konsequenzen nach sich zieht, darüber konnten bisher nur Vermutungen angestellt werden. Ebenso ungeklärt ist, welche Bedeutung die in den Serumproteinen und hier vor allem im Albumin vorgefundene Menge an Aminosäuregebundener Glucose(10,11,15,16,26,40,49) für das Krankheitsgeschehen hat.

Chemisch liegt der Bindung eine Schiff'sche Base zugrunde. Diese entsteht aus der Carbonylgruppe des Zuckers mit der freien Aminogruppe einer entsprechenden Aminosäure. Das Produkt, ein Aldimin, wird durch Amadori-Umlagerung zum korrespondierenden Ketoamin iso-

merisiert(29,30)(siehe Fig. 1). Da zur Reaktion keine Enzyme nötig sind, wurde der Begriff "nichtenzymatische Glucosylierung" für diese Bindung eingeführt.

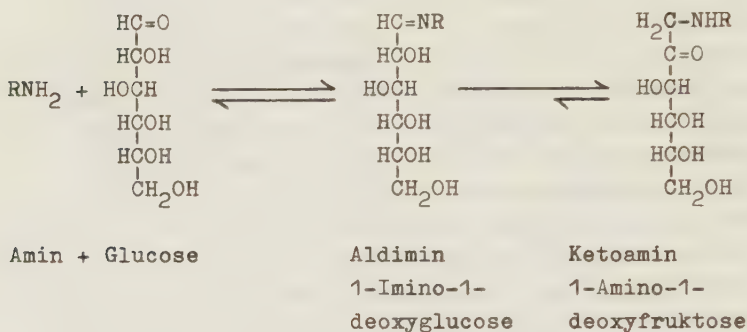
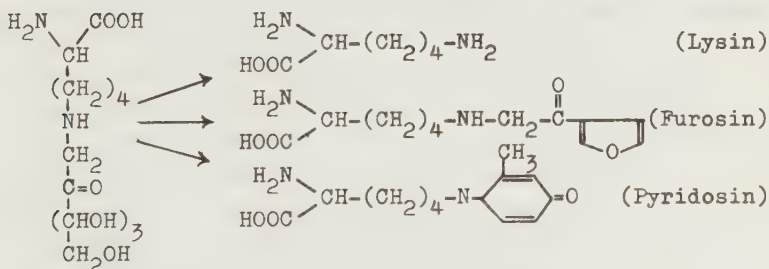


Fig. 1: Amadori-Umlagerung

Nach der Reaktion von Glucose mit einer Aminogruppe lagert sich das gebildete Aldimin (=Schiff'sche Base) zum Ketoamin um, welches stabil ist;

Die Amadori-Umlagerung ist unter physiologischen Bedingungen praktisch irreversibel, so daß das Produkt in vivo stabil ist. Auch wurde bisher noch kein Enzym gefunden, welches diese Spaltung katalysieren könnte. Im Hämoglobin HbA<sub>1c</sub> liegt die reaktionsfähige Amino-gruppe am endständigen Valin der  $\beta$ -Kette(31), aber auch  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinresten sind betroffen. In der Hauptfraktion, dem Hämoglobin A II, ist die Glucose nur an  $\epsilon$ -Amino-Gruppen von Lysinen gebunden (8).

Den Grundstein zum Nachweis von Aminosäure-gebundenen Zuckern legte Gottschalk(25). Er behandelte N-substituierte Fruktosamine mit milder Säure, was zur Bildung von 5-Hydroxymethylfurfural(HMF) führte. Keeney und Basette bauten hierauf einen Farbttest auf, indem sie HMF mit 2-Thiobarbitursäure zu einem Farbkomplex umsetzten(32). Dieses Verfahren wurde später zur Bestimmung von glucosyliertem Hämoglobin(22) und zur Analyse anderer nichtenzymatisch glucosylierter Proteine herangezogen. Der 2-Thiobarbitursäuretest wird allgemein als spezifisch für Ketoaminbindungen in glucosylierten Proteinen angesehen, jedoch ist das nur bedingt richtig, da auch andere Kohlehydratbindungen unter diesen Bedingungen zur Bildung von 5-Hydroxymethylfurfuraldehyd beitragen können(40). Von Finot et al.(20) und Heyns et al.(28) wurden nach saurer Hydrolyse von Lysin-gebundener Fruktose Produkte isoliert, welche spezifisch für das Vorliegen der Ketoaminbindung sind.



### $\epsilon$ -D-Fruktoselysine

Fig. 2: Reaktionsprodukte von Fruktoselysine nach Hydrolyse in 6N HCl für 18h bei 95°C; (Lysin=50%, Furosin=30%, Pyridosin=10%);

Es handelt sich neben Lysin im wesentlichen um Furosin (=  $\epsilon$ -N(2-furoylmethyl)-L-Lysin) und Pyridosin (=  $\epsilon$ -(3-hydroxy-4-oxo-6-methyl-1-pyridinyl)-L-norleucin) (siehe Fig. 2)(21). Furosin, das mit einer Ausbeute von ca. 30% entsteht, erwies sich für die Bestimmung Lysin-gebundener Glucose in Proteinen als besonders geeignet. Es läßt sich durch UV-Absorption des Furanrings nach Hochdruckflüssigkeitschromatographie(HPLC) quantitativ messen(40).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Vorkommen und Ausmaß der nichtenzymatischen Glucosylierung der verschiedenen Serumproteinfraktionen bei Diabetikern und Nichtdiabetikern zu untersuchen, nachdem bisher nur Daten über die Albuminfraktion und das Gesamtserumprotein vorlagen(10,11,15,16,26,33,40,48,49,50). Darüberhinaus interessierte die Einbaugeschwindigkeit von Glucose in das Albumin sowie die Eliminationsrate von nichtenzymatisch glucosyliertem Albumin aus dem Blutplasma. Weitere Untersuchungen galten schließlich der Frage, ob und in welcher Menge nichtenzymatisch glucosylierte Proteine bzw. ihre Abbauprodukte im Urin vorkommen.

## B) Materialien und Geräte

### 1. Materialien

L-(U-<sup>14</sup>C)Lysine monohydrochloride aqueous solution containing 2% ethanol, 339mCi/mmol: Fa. Radiochemical Centre Amersham, Braunschweig;  
Dowex 50 WX 2: Fa. Serva Heidelberg;  
Cellogel-Blöcke 60x170x2,5mm, Cellogel-Streifen 40x170mm: Fa. Chemetron, Mailand, Italien;  
Filterpapier: Fa. Schleicher und Schüll, Einbeck;  
Glasscheiben, Ponceau-S-Färbelösung, Eisessig, Zusatz zur Entfärbelösung: Fa. Vogel, Gießen;  
500ml Aminofusin-Infusionen(10%), 500ml Glucose-Infusionen(20%): Fa. Pfrimmer, Erlangen;  
100ml Humanalbumin-Infusionen(20%): Fa. Hyland, USA;  
Saccharose: Fa. Südzucker AG, Mannheim;  
Humanalbumin, Gammaglobulin: Fa. Behring, Marburg;  
L-(U-<sup>14</sup>C)Lysin-Glucose: Dr. Schleicher, Schwabinger Krankenhaus München;  
Fruktoselysinstandard: Prof. Erbersdobler, Tiermedizinische Fakultät, München;  
Von der Firma Merck, Darmstadt, wurde bezogen:  
Veronal-Puffer (5,5-Diäthylbarbitursäure zur Analyse 7,36g, Na-Salz der 5,5-Diäthylbarbitursäure 41,20g, Tris-(hydroxymethylaminomethan) zur Analyse 28,80g ad 4l H<sub>2</sub>O); Methanol; Uranylacetat 0,16g/dl in physiologischer NaCl; 1N Oxalsäure (=0,5M); 2-Thiobarbitursäure; 2,5N u. 3N Trichloressigsäure; Transformationslösung; PBS-Puffer Nr. 14051; 0,33mmol/l Perchlorsäure; Na-Azid; EDTA; Glucose=monohydrat; Natriumborhydrid(NaBH<sub>4</sub>); Toluol; Äther; 1N u. 0,1N HCl; Polyäthylen-Glycol(=PEG) 250g/l; 8,4mmol/l Phosphorsäurepuffer;

## 2. Geräte

Elektrophoresegerät: LKB Brumma 2117 Multiphorese,  
LKB Biochrom 2103 Power Supply, Kühlung MGW Lauda  
Ultra Kryomat TK 30D: Fa. LKB Brumma, Schweden;  
Minicon-Filter S.15: Fa. Amicon, Mass., USA;  
Millipore-Filter 0,45µm: Fa. Millipore Corp.,  
Bedford, USA;

Vollautomatisches, programmiertes Injektionsgerät:  
Wisp Sampler; Pumpe: Solvent Delivery System  
Modell 6000A; UV-Detektor: Modell 440; Proben=  
gläschen; alle Fa. Waters Associates, Inc.,  
Milford, USA;

2-Kanal-Schreiber: Fa. Servogor, Austria;  
Chromatographiesäule: 5µ C<sub>18</sub>-Säule(200x4mm):  
Fa. Macherey-Nagel, Düren;  
Glasampullen (1ml): Fa. Schultheiss, München;  
Eppendorf-Wärmeblock (95°C): Fa. Eppendorf,  
Hamburg;

Rotavapor: Fa. Büchi, Schweiz;  
Zeissphotometer PM 4: Fa. Zeiss, Oberkochen;

## C) Methoden

### 1. Bestimmung von Furosin

#### 1.1. Hochdruckflüssigkeitschromatographie(HPLC)

Das HPLC-System(40) setzt sich aus einer Pumpe, dem Injektionsautomaten WISP und einem UV-Detektor mit nachgeschaltetem 2-Kanal-Schreiber zusammen. Daran angeschlossen war eine 5µ C<sub>18</sub>-Chromatographiesäule(200x4mm). Die Eluierung erfolgte mit 8,4mMol/l Phosphatpuffer(pH=2,0) bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 1ml/min. Zur Analyse wurden je nach Konzentration der Lösung zwischen 5 und 200µl der hydrolysierten Probe (siehe 1.2.) appliziert. Proben und Elutionspuffer wurden mit einem Millipore-Filter von 0,45µm Porengröße vorgereinigt, der Elutionspuffer zusätzlich noch für 30min bei Unterdruck entgast. Die Detektorempfindlichkeit war bei AUFS= 0,01 eingestellt. Die Absorption wurde gleichzeitig bei den Wellenlängen 254 und 280nm aufgezeichnet. Bei einer Schreibergeschwindigkeit von 0,5cm/min erschien im Chromatogramm Furosin nach 2min 36sec, Tyrosin nach 8min und Phenylalanin nach ca. 12min (siehe Fig. 3). Die jeweils gemessenen Substanzmengen verhalten sich zur Peakhöhe im Chromatogramm proportional. Als Meßparameter für die  $\epsilon$ -Lysin-gebundene Glucose dient die Peakhöhe des Furosins, als Meßparameter für die Albuminmenge die Peakhöhe des Tyrosins bzw. des Phenylalanins. Für alle Proteine wurde humanes Serumalbumin als Standard verwendet. Die Eichung des Systems erfolgte durch Messung von Fruktoselysin- und Albuminstandards bekannter Konzentration (Vorbehandlung siehe 1.2.).

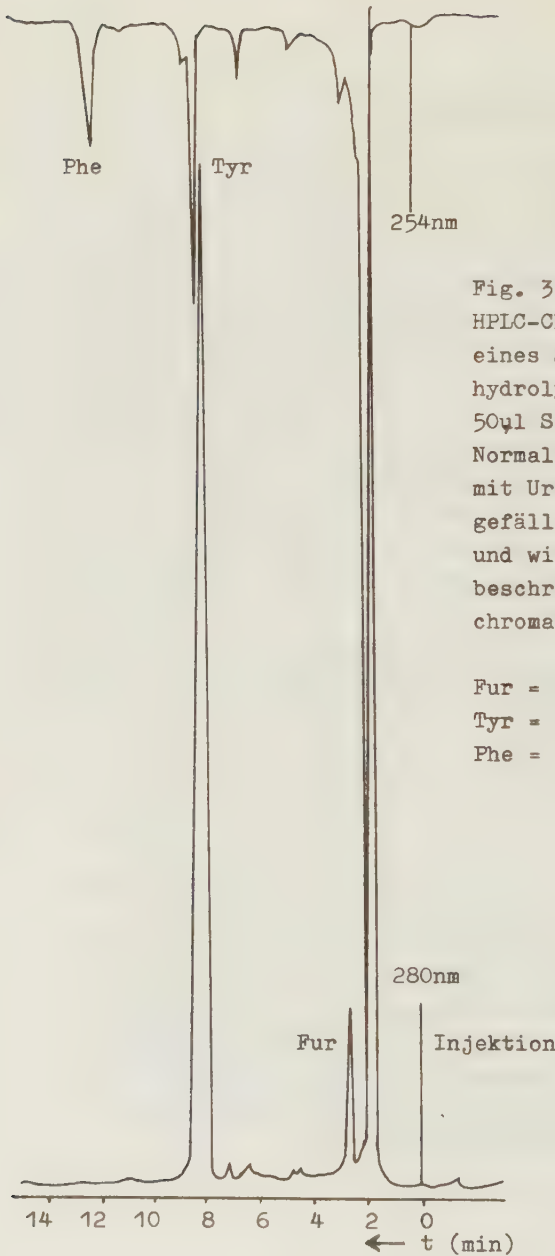


Fig. 3:  
HPLC-Chromatogramm  
eines Serumprotein=  
hydrolysats;  
50µl Serum einer  
Normalperson wurden  
mit Uranylacetat  
gefällt, hydrolysiert  
und wie unter 1.1.  
beschrieben  
chromatographiert;

Fur = Furosin  
Tyr = Tyrosin  
Phe = Phenylalanin

## 1.2. Proteinfällung und Hydrolyse

Um den Einfluß der Anwesenheit von Glucose zu untersuchen, wurde eine Lösung aus Humanalbumin (50g/l) mit steigenden Glucosekonzentrationen von 0; 5,5; 11,1; 27,7 und 55,5mmol/l versetzt und jeweils mit Uranylacetat, Trichloressigsäure oder Perchlorsäure gefällt. Eine weitere Probenreihe blieb ungefällt und wurde als solche gemeinsam mit den übrigen Proben bei 95°C über 18h mit 6N HCl hydrolysiert(5).

Der Einfluß der Hydrolysetemperatur und -Zeit auf die Ausbeute an Furosin wurde untersucht. 50µl Serum bzw. Uranylacetatniederschlag wurden mit 0,5ml 6N HCl versetzt und in zugeschmolzenen Glasampullen bei 95°C, 120°C, 140°C und 160°C hydrolysiert. Proben wurden stündlich zur Furosinbestimmung entnommen.

## 2. Bestimmung von 5-Hydroxymethylfurfural(HMF)

### 2.1. Thiobarbitursäurereaktion für HbA<sub>Ia-c</sub>

Die Bestimmung von HbA<sub>Ia-c</sub> erfolgte nach einer Anleitung des Klinisch Chemischen Instituts im Schwabinger Krankenhaus, München(17). Für die Probengewinnung waren ca. 5ml heparinisiertes Vollblut nötig. Die abzentrifugierten Erythrozyten wurden dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Von den gepackten Erythrozyten wurden 0,5ml mit 0,75ml H<sub>2</sub>O versetzt und für 2min im Eisbad gekühlt. Die Probe wurde mit 0,25ml Toluol hämolysiert, anschließend wurde das Toluol wieder abgesaugt. 20µl des Hämolysats dienten zur Hämoglobinbestimmung. Zur HbA<sub>Ia-c</sub>-Bestimmung wur-

de das Hämolysat auf 1g Hb/dl mit  $H_2O$  verdünnt, und 1ml dieser Lösung mit 0,5ml 1N Oxalsäure 5h bei  $100^{\circ}C$  erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde abgekühlt und mit 0,5ml 2,5N Trichloressigsäure versetzt. Nach Zentrifugation wurden 0,75ml Überstand entnommen und mit 0,25ml 0,05M Thiobarbitursäure 15min bei  $37^{\circ}C$  und weitere 20min bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 443nm gegen den Reagenzienleerwert am Zeissphotometer gemessen. Für die Berechnung des  $HbA_{Ia-c}$  gilt folgende Formel:

$$HbA_{Ia-c}(\%) = (\Delta E_{443} - 0,106) \times 40;$$

## 2.2. Thiobarbitursäurereaktion zur Bestimmung nicht fällbarer Aminosäuren und Peptide im Serum und Urin

Für die 5-Hydroxymethylfurfural-Bestimmung (modifiziert nach (15)) wurde 1ml einer Lösung von Aminosäuren und Peptiden, die nach 4.2. erhalten wurde, mit 0,15ml Eisessig versetzt und 24h auf  $100^{\circ}C$  erhitzt. Nach Abkühlung erfolgte die Zugabe von 0,4ml 2,5N Trichloressigsäure. Nach Zentrifugation wurde 1ml des Überstandes zusammen mit 0,5ml 0,05M Thiobarbitursäure für 30min bei  $40^{\circ}C$  inkubiert. Die Messung erfolgte gegen die mit Natriumborhydrid reduzierte Probe am Zeissphotometer bei 443nm Wellenlänge. Zur Berechnung wurde ein synthetischer Standard von Fruktoselysin bekannter Konzentration, der wie die Probe behandelt wurde, verwendet.

### 3. Elektrophoretische Trennung und Isolierung von Serumproteinen

Für die Bestimmung der nichtenzymatischen Glucosylierung in den Serumproteinfraktionen eignete sich die Auftrennung durch präparative Elektrophorese auf Cellogel-Blöcken in Veronalpuffer (pH=9,4). Zuvor wurden die Cellogel-Blöcke und die analytischen Cellogel-Streifen 24h mit Veronalpuffer äquilibriert. Es ließen sich pro Cellogel-Block zweimal 200µl in den in Fig. 4 gezeigten Abständen auftragen. Zur Lokalisierung der Proteinfraktionen wurden über die Cellogel-Blöcke Cellogelstreifen gelegt. Die Auftrennung dauerte bei 0,5kV und 5mA etwa 4h. Die Nachweiststreifen wurden dann abgenommen und mit Ponceau S gefärbt. Für die Trocknung wurden die Nachweiststreifen zwischen zwei Glasplatten eingespannt, um ihre Schrumpfung zu verhindern. Auf die Glasplatten ließen sich nun deckungsgleich die zugehörigen Cellogel-Blöcke legen, und entsprechende Blockabschnitte nach dem vorgezeichneten Muster ausschneiden. Zur Elution der Proteine wurden diese zerkleinert und in einer Injektionsspritze ausgepreßt. Das Exprimat wurde durch Minicon-Filter S 15 auf ein Volumen von 50-100µl konzentriert und mit Uranylacetat gefällt. Der Niederschlag wurde hydrolysiert und, wie oben beschrieben, durch HPLC analysiert.

### 4. Isolierung von Fruktoselysin aus Serum und Urin

#### 4.1. Isolierung aus Urin

20ml Urin der 24h Harnmenge wurden zentrifugiert und durch ein Millipore-Filter (0,45µm) filtriert. Als

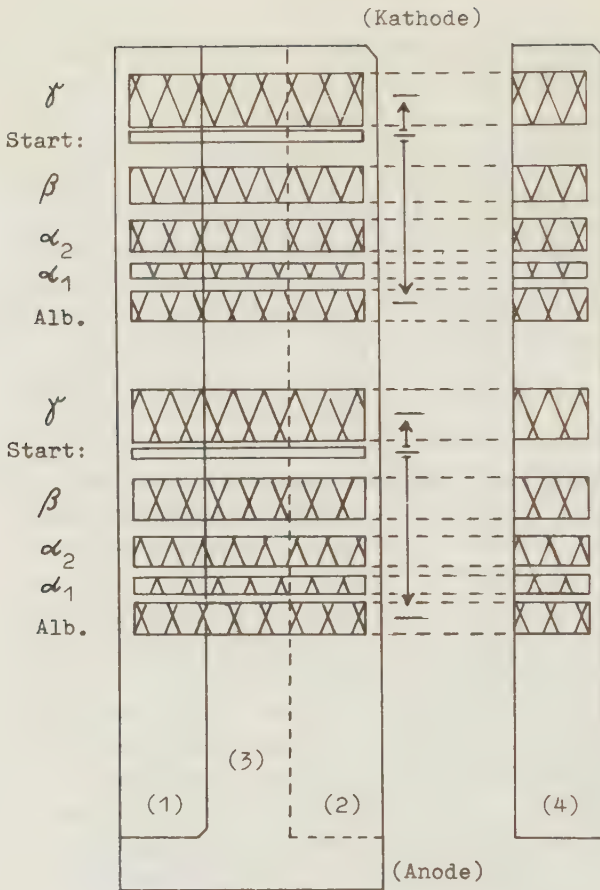


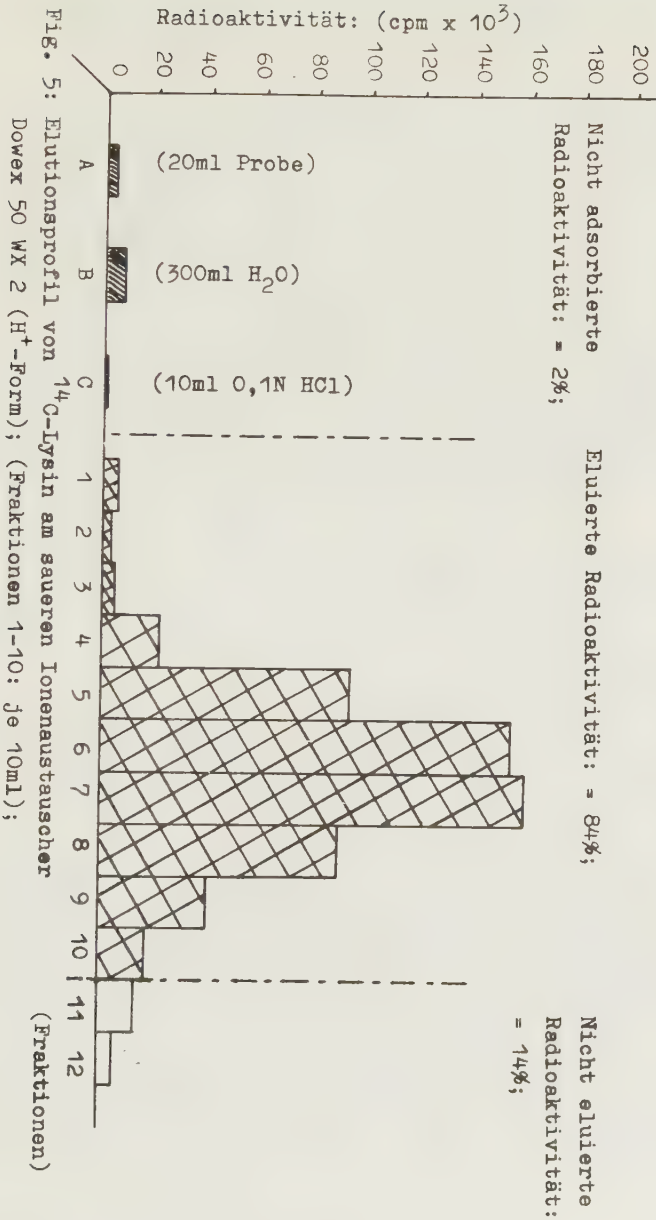
Fig. 4:

Schematische Darstellung der Auftrennung der Serumproteinfraktionen, Aufsicht;

Lage der analytischen Cellogel-Streifen (1), (2) auf dem präparativen Cellogel-Block (3);

Analytischer Cellogel-Streifen nach Elektrophorese und Proteinanfärbung (4);

(Alb.,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  = Serumproteinfraktionen);



interner Standard wurden 10  $\mu$ l L-(U- $^{14}$ C)Lysin-HCl ( $7,2 \times 10^5$  cpm) zugegeben, nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß sich markiertes Lysin säulenchromatographisch wie markiertes Fruktoselysin verhält. Nach Entnahme von 0,5 ml zur Bestimmung der Ausgangsradioaktivität wurde die Probe auf eine Ionenaustauschersäule (Dowex 50 WX 2 H $^+$ -Form) gegeben. Nach Waschen mit 300 ml H $_2$ O wurde die Säule mit 10 ml 0,1 N HCl angesäuert. Die Elution erfolgt nahezu vollständig mit 100 ml 1 N HCl in zehn 10 ml-Fractionen (Fig. 5). Die Ausbeute an Fruktoselysin wurde aus der Radioaktivität des internen Standards ermittelt. Zur  $^{14}$ C-Lysinbestimmung wurden aus dem Eluat 0,5 ml entnommen. Der Rest wurde zur Trockene eingeengt, mit 4 ml H $_2$ O gelöst und nach dem unter 2.2. beschriebenen Verfahren zur HMF-Bestimmung weiterbehandelt.

#### 4.2. Isolierung aus Serum

Die Isolierung der freien, glucosylierten Aminosäuren aus dem Blutplasma erfolgte prinzipiell gleich, wie unter 4.1. beschrieben. Aus ca. 50 ml EDTA-Plasma wurde das Eiweiß mit 10 ml 3 N Trichloroessigsäure ausgefällt. Anschließend wurde die Trichloroessigsäure aus dem Überstand mit Äther extrahiert. Die wäßrige Phase wurde analog 4.1. einrotiert, dann in H $_2$ O gelöst und hydrolysiert. Die Analyse erfolgte im Gegensatz zu 4.1. durch HPLC. Zur Berechnung wurde ein unter denselben Bedingungen vorbehandelter, bekannter Fruktoselysinstandard herangezogen.

## 5. Präparative Darstellung von nichtenzymatisch glucosyliertem Humanalbumin für Infusionszwecke

Die Glucosylierung von Humanalbumin durch Inkubation mit Glucose erfolgte unter sterilen Bedingungen. Dazu wurde 20%ige Humanalbumin-Infusionslösung mit 1,1M Glucose-Infusionslösung gemischt. Aus 4 Flaschen Albumin-Infusion á 100ml und 2 Flaschen Glucose-Infusion á 500ml ergab sich auf Grund methodisch bedingter Volumenveränderung eine Lösung von 1160ml, die 72g Albumin und 0,76Mol/l Glucose enthielt. Diese Lösung war zwar hyperosmolar, enthielt aber eine etwa den physiologischen Verhältnissen entsprechende Humanalbuminkonzentration. Nach 6 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung innerhalb von 40min (=27,5ml/min) im Selbstversuch i.v. infundiert. Darauf folgten kurzzeitige Blutabnahmen, um die Clearance des glucosylierten Albumins zu verfolgen. Aus einem Rest der Infusionslösung wurde der Glucosegehalt des infundierten Albumins bestimmt.

## 6. Modellversuche zur nichtenzymatischen Glucosylierung von Humanalbumin unter steady-state Bedingungen, in vitro

Zwei Proben von je 10ml 5%iger Humanalbuminlösung in 10mMol/l K-Phosphat- u. 140mMol/l NaCl-Puffer(pH=7,4), die 7,2mMol/l bzw. 14,4mMol/l Glucose enthielten, wurden verschlossen bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Als Bakterizid enthielten die Proben 0,2%  $\text{NaN}_3$ . Zwei identische Proben wurden bei -18°C aufbewahrt. Ein "Proteinturnover" wurde durch laufenden Ersatz einer definierten Probemenge durch frische Albuminlösung imitiert. Das weitere Vorgehen ist unter D3 beschrieben.

## D) Ergebnisse und Diskussion

### 1. Furosinbestimmung

#### 1.1. Proteinfällung

Die Bestimmung von Furosin in Serumproteinen ist nach vorausgegangener Fällung mit Uranylacetat, Trichloroessigsäure oder Perchlorsäure nicht abhängig von der Glucosekonzentration im Blutplasma. Die Ausbeute an Furosin war etwas unterschiedlich, mit Trichloroessigsäure am niedrigsten und mit Perchlorsäure am höchsten. Uranylacetat, welches die am besten reproduzierbaren Ergebnisse aufwies, wurde durchweg verwendet. Polyäthylen-Glycol erwies sich als Fällungsmittel als unbrauchbar. Ohne Fällung der Serumproteine wurden durch die Anwesenheit von Glucose etwas zu hohe Furosinwerte gemessen. Dieser Fehler von etwas weniger als 10% des Durchschnittswertes der Serumproteine von Nichtdiabetikern bei 100mg/dl Glucose läßt sich im physiologischen Bereich vernachlässigen.

( $MW_{\text{Nichtdiabetiker}} = 3,10 \text{ nMol Lys.-Gluc./mg Protein}$ )

#### 1.2. Hydrolyse

Die optimale Hydrolysetemperatur beträgt  $120^{\circ}\text{C}$  (siehe Fig. 6), wobei bereits nach einer Stunde die größte Ausbeute an Furosin vorliegt. Höhere Temperaturen und längere Hydrolysezeiten verschlechtern die Ausbeute an Furosin sowohl bei Uranylacetat als auch bei nativem Serum, so daß die von früheren Untersuchern(5,40) angegebene Hydrolysezeit von 18h bei  $95^{\circ}\text{C}$  für Routinemessungen nicht eingehalten werden muß. Bei  $95^{\circ}\text{C}$  erwiesen sich schon 5h Hydrolysezeit als ausreichend.

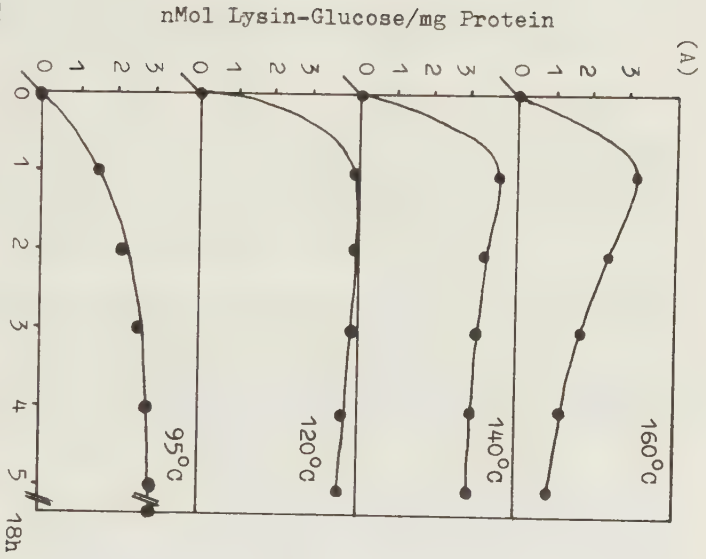
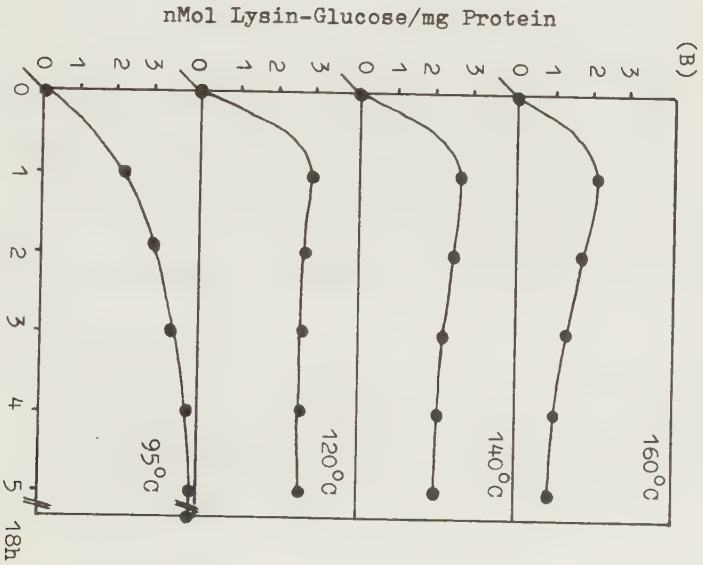


Fig. 6: Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Purosinebildung, Hydrolyse mit 6N HCl;



(A): Uranylacetatfällung  
(B): ungefällt

## 2. Nichtenzymatische Glucosylierung von Serumproteinen bei Diabetikern und Nichtdiabetikern

### 2.1. Fruktoselysingehalt in den Proteinfractionen des Serums bei Diabetikern und Nichtdiabetikern

Die Bestimmung von gebundener Glucose in den Proteinfractionen des Serums beschränkt sich auf die Aminosäure Lysin. Andere Aminogruppen wie z.B. die des endständigen Valins im Hämoglobin(4,12,34) wurden nicht erfaßt und dürften quantitativ von untergeordneter Bedeutung sein.

Eine Patientengruppe umfaßte Personen, bei denen bislang kein Diabetes mellitus bekannt war, die andere Patienten mit bekanntem Diabetes mellitus. Probanden, welche auf Grund ihres gesamten Krankheitsbildes weitgehende Veränderungen in der Stoffwechselsituation vermuten ließen, wurden ausgeschlossen. Tab. 1 zeigt das Ausmaß der Glucosylierung bei Nichtdiabetikern, Tab. 2 die Verhältnisse bei Diabetikern. In beiden Tabellen wurde neben der Glucosylierung des Gesamtserums und der Einzelfractionen auch die Summe aus den glucosylierten Einzelfractionen unter Berücksichtigung ihres Proteinanteils am Gesamtserum ermittelt. Wie ersichtlich stimmen die Werte für das Gesamtserum mit der Summe der Einzelfractionen sehr gut überein. Es gilt für die Glucosylierung des Gesamtserums folgende Summenformel:

$$\begin{aligned} \text{Alb}(\%) \times \text{Fl}_{\text{Alb}} + \alpha_1(\%) \times \text{Fl}_{\alpha_1} + \alpha_2(\%) \times \text{Fl}_{\alpha_2} + \beta(\%) \times \text{Fl}_{\beta} + \gamma(\%) \times \text{Fl}_{\gamma} = \\ = 100\% \times \text{Fl}_{\text{Gesamtserum}} \end{aligned}$$

Fl = Fruktoselysin;

Alb,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  = Fraktionen des Serumproteins;

(%) = prozentualer Anteil an der Gesamtfraction des Serumproteins;

| Fraktion              | Mittel=<br>wert | Standard=<br>abweichung | Bereich   | Mittelwert/<br>MW <sub>Gesamtser.</sub> |
|-----------------------|-----------------|-------------------------|-----------|-----------------------------------------|
| Gesamt-S              | 3,10            | 0,27                    | 2,70-3,64 | 1,00                                    |
| Albumin               | 3,89            | 0,32                    | 3,33-4,47 | 1,26                                    |
| $\alpha_1$ -Frakt.    | 2,88            | 0,74                    | 1,51-4,32 | 0,93                                    |
| $\alpha_2$ -Frakt.    | 1,72            | 0,33                    | 0,88-2,24 | 0,55                                    |
| $\beta$ -Frakt.       | 1,60            | 0,29                    | 1,09-2,39 | 0,52                                    |
| $\gamma$ -Frakt.      | 1,62            | 0,23                    | 1,04-1,98 | 0,52                                    |
| Summe d.<br>Einzelfr. | 3,11            | 0,25                    | 2,70-3,54 | 1,00                                    |

Tab. 1: Nichtenzymatische Glucosylierung menschlicher Serumproteine bei Nichtdiabetikern nach elektrophoretischer Trennung (n=20); Mittelwerte, Standardabweichung u. Bereich in nMol Lysin-Glucose/mg Protein;

| Fraktion              | Mittel=<br>wert | Standard=<br>abweichung | Bereich    | Mittelwert/<br>MW <sub>Gesamtser.</sub> |
|-----------------------|-----------------|-------------------------|------------|-----------------------------------------|
| Gesamt-S              | 8,03            | 2,39                    | 4,84-12,90 | 1,00                                    |
| Albumin               | 10,96           | 3,29                    | 5,93-17,06 | 1,37                                    |
| $\alpha_1$ -Frakt.    | 6,68            | 1,99                    | 3,90-10,82 | 0,80                                    |
| $\alpha_2$ -Frakt.    | 3,76            | 0,97                    | 2,50- 5,98 | 0,49                                    |
| $\beta$ -Frakt.       | 3,47            | 0,89                    | 2,39- 5,62 | 0,45                                    |
| $\gamma$ -Frakt.      | 3,59            | 0,87                    | 2,39- 5,30 | 0,46                                    |
| Summe d.<br>Einzelfr. | 8,04            | 2,32                    | 4,74-12,74 | 1,01                                    |

Tab. 2: Nichtenzymatische Glucosylierung menschlicher Serumproteine bei Diabetikern nach elektrophoretischer Trennung (n=20); Mittelwerte, Standardabweichung u. Bereich in nMol Lysin-Glucose/mg Protein;

Als relativer Maßstab für die Glucosylierung der Einzelfractionen im Serum wurde die Glucosylierung des betreffenden Gesamtserums gewählt. Es zeigte sich, daß mit Ausnahme des Albumins alle übrigen Fractionen bis zur Hälfte unter der Glucosylierung des Gesamtserums liegen. Das Albumin macht auf Grund seines hohen Anteils am Serum (durchschnittlicher Albuminanteil im Nichtdiabetikerkollektiv = 64,5%, im Diabetikerkollektiv = 60,2%) und seiner überdurchschnittlichen Glucosylierung rund 80% des glucosylierten Serumproteins aus. Die restlichen 20% verteilen sich auf die  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Fraction mit zusammen 35-40% Anteil am Gesamtprotein. Allein die  $\alpha_1$ -Fraction, die sich aus Antitrypsin, dem  $\alpha_1$ -Lipoprotein und aus saurem Glycoprotein zusammensetzt(3), nimmt eine Mittelstellung ein, was den von R. Dolhofer in einer früheren Arbeit gefundenen Werten entspricht(15).

## 2.2. Vergleich des Diabetikerkollektivs mit dem Nichtdiabetikerkollektiv

Vergleicht man Diabetiker und Nichtdiabetiker, so lassen sich mit Ausnahme des Glucosylierungsgrades keine auffallenden Unterschiede in der Serumproteinelektrophorese nachweisen. Wie in Fig. 7 gezeigt ist, ist das Verteilungsmuster für glucosylierte Proteine für beide Kollektive nahezu identisch. Allein die Glucosylierung des Albumins tritt bei Diabetikern gegenüber den restlichen Fractionen stärker in den Vordergrund. Dies läßt sich dahingehend interpretieren, daß höher glucosyliertes Albumin nicht bevorzugt abgebaut wird, und daß die Verschiebung zu Gunsten des Albumins möglicherweise durch einen relativ beschleunigten Umsatz der Fractionen  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  im Rahmen von gehäuf-ten Begleitkrankheiten bedingt ist. Darüberhinaus wäre

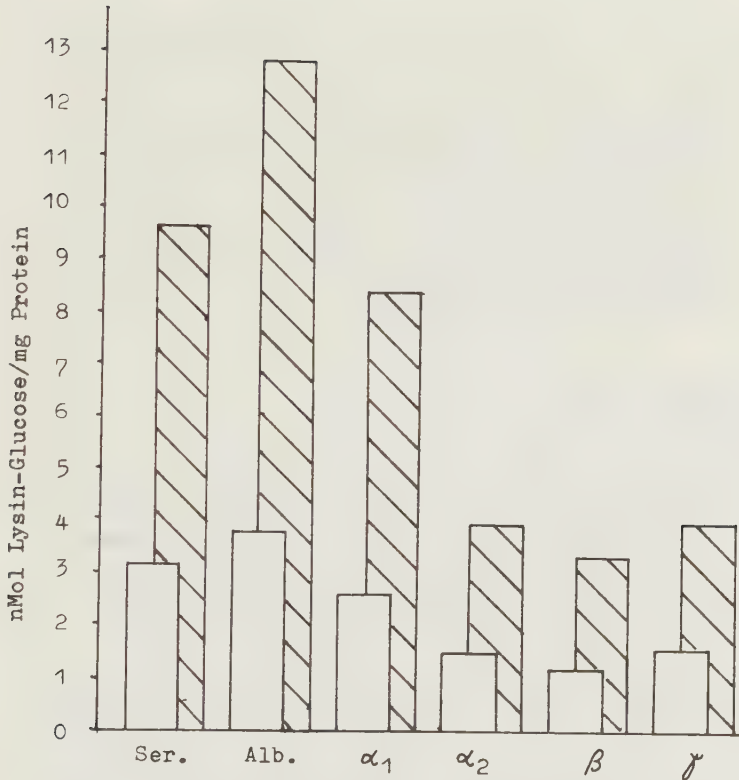


Fig. 7: Nichtenzymatische Glucosylierung der Serumproteinfraktionen nach elektrophoretischer Trennung (Ser.=Gesamtserum; Alb.,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ =Serumproteinfraktionen);  
□ = Nichtdiabetiker, ▨ = Diabetiker;

eine verlängerte Verweildauer von Albumin im Organismus bei verminderter Neusynthese vorstellbar.

### 2.3. Befunde bei Störungen in der Konzentration und Zusammensetzung des Plasmaeiweißes

Seren, die eine pathologische Elektrophorese aufweisen, weichen auch in ihrem Glucosylierungsmuster von der Norm ab. Besonders trifft dies bei extrem katabolen Zuständen zu, wo das Bluteiweiß als Nährstoffservoir dient und damit beträchtlichen Veränderungen in seiner Zusammensetzung unterliegt. Exemplarisch für Pathoproteinämien wurden Synthesestörungen in der Leber, Proteinurien und konsumptive Prozesse am Beispiel des Plasmozytoms untersucht.

#### 2.3.1. Proteinurien

Beruhet ein Verlustsyndrom auf einem Nierenschaden, so ist je nach Ausmaß und Art eine unterschiedlich starke Proteinurie zu erwarten. Die Ausscheidung unterschiedlich glucosylierter Proteine sollte zu verschiedener Zusammensetzung im Glucosylierungsmuster führen, je nachdem, welche Proteinmoleküle bevorzugt verlorengehen. Es wurden 21 Urinproben mit einer mittleren Eiweißkonzentration von 3,74g/l (Bereich: 0,3 - 10g/l) untersucht. Der durchschnittliche Glucosylierungswert des Serums betrug 2,6nMol Lysin-Glucose/mg Protein, was dem in Tab. 1 gefundenen Mittelwert im Serumprotein von 3,10nMol Lysin-Glucose/mg Protein nahekommt. Die Standardabweichung ist mit 1,78nMol Lysin-Glucose/mg Protein dabei relativ groß. Diese Befunde deuten darauf hin, daß die glucosylierten Serumproteine nicht selektiv in den Urin ausgeschieden werden. Der nega-

tive Korrelationskoeffizient von  $r = -0,19$  zwischen dem Ausmaß der Proteinurie und der Glucosylierung der Serumproteine spricht dagegen, daß eine schwere Proteinurie in zunehmendem Maße die Verhältnisse im Serum wiedergeben müßte.

### 2.3.2. Leberfunktionsstörungen

Um den Einfluß von Proteinsynthesestörungen auf die Glucosylierung von Serumproteinen zu studieren, wurden Untersuchungen bei Erkrankungen der Leber, dem Bildungsort der meisten Plasmaproteine, durchgeführt. Wie Tab. 3A zeigt, weisen Leberkranke zum Teil höhere Glucosylierungswerte auf im Vergleich zu gesunden Probanden. Daraus ist zu folgern, daß die vermehrte Bildung von  $\gamma$ -Globulin nicht unbedingt von einem gleichfalls verstärkten Abbau begleitet ist, sondern (Ausnahme Fall 4 = Leberzirrhose) zu einer vielleicht kompensatorisch verlängerten Verweildauer und dadurch höheren Glucosylierung führt. Wie in Tab. 3 für den Fall 2 und 3 gezeigt ist, könnte dies auch für das Albumin zutreffen, was angesichts verminderter Bildung einen sinnvollen Mechanismus zur Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks darstellen würde. Bei Leberfunktionsstörungen verteilt sich das glucosylierte Protein im wesentlichen auf die Albumin- und die  $\gamma$ -Globulinfraktion. Ihre Glucosylierungswerte liegen teilweise über denen des Normalkollektivs (Albuminrelation pathologisch : nichtpathologisch = 1,57 : 1,26;  $\gamma$ -Globulinrelation pathologisch : nichtpathologisch = 0,64 : 0,52). Die übrigen Fraktionen  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\beta$  spielen dabei eine geringere Rolle.

(A)

| Nr. | Diagnose            | Eiweiß<br>(g/dl) | Lys.-<br>Gluc. | Alb.<br>in % | Lys.-<br>Gluc. | $\gamma$ -Glob.<br>in % | Lys.-<br>Gluc. | Albumin/<br>Serum | $\gamma$ -Globulin/<br>Serum |
|-----|---------------------|------------------|----------------|--------------|----------------|-------------------------|----------------|-------------------|------------------------------|
| 1   | Hepatitis           | 6,9              | 3,07           | 53,2         | 3,74           | 31,4                    | 2,03           | 1,22              | 0,66                         |
| 2   | Hepatitis           | 6,8              | 3,28           | 47,9         | 5,30           | 36,6                    | 1,92           | 1,62              | 0,59                         |
| 3   | chron.<br>Hepatitis | 7,0              | 3,54           | 50,1         | 5,51           | 26,7                    | 2,18           | 1,56              | 0,62                         |
| 4   | Leber=<br>cirrhose  | 5,3              | 2,03           | 40,4         | 3,80           | 33,5                    | 1,35           | 1,87              | 0,67                         |
|     |                     |                  |                |              |                |                         |                | $\bar{x} = 1,57$  | $\bar{x} = 0,64$             |

(B)

| Nr. | Diagnose              | Lys.-<br>Gluc. | Alb.<br>in % | Lys.-<br>Gluc. | Paraprotein<br>in % | Lys.-Gluc.<br>Paraprotein |
|-----|-----------------------|----------------|--------------|----------------|---------------------|---------------------------|
| 1   | $\beta$ -Plasmocytom  | 3,58           | 45,9         | 5,10           | $\beta = 43,9\%$    | $\approx 1,51$            |
| 2   | $\gamma$ -Plasmocytom | 2,70           | 34,2         | 5,56           | $\gamma = 55,7\%$   | $\approx 0,88$            |

Tab. 3: Nichtenzymatische Glucosylierung von menschlichen Serumproteinfraktionen bei Hepatopathien(A) und Plasmocytomen(B) nach elektrophoretischer Trennung; Lysin-Glucose-Gehalt(Lys.-Gluc.) in nMol Lys.-Gluc./mg Protein;

### 2.3.3. Plasmozytome

Ähnliche Verhältnisse sind bei Plasmozytomen zu vermuten (Tab. 3), wo das betreffende Paraprotein stark überrepräsentiert, aber relativ niedrig glucosyliert ist, während die mengenmäßig reduzierte Albuminfraktion überdurchschnittlich hoch glucosyliert ist. Dies gilt für alle anderen glucosylierten Fraktionen, so daß bei bekannter Glucosylierungsgeschwindigkeit ein Rückschluß auf die Austauschrate von Serumproteinen möglich ist.

## 3. Nichtenzymatische in vitro Glucosylierung von menschlichen Serumproteinen

### 3.1. Albumin

Die nichtenzymatische Glucosylierung ist in vivo von der Temperatur, dem pH-Wert, der Halbwertszeit des Proteins und der Glucosekonzentration des Milieus abhängig(15). Ob die Reaktion im lebenden Organismus oder unter Versuchsbedingungen im Reagenzglas abläuft, sollte ihre Geschwindigkeit nicht beeinflussen, sofern gleiche Bedingungen vorliegen. Um dies zu zeigen, wurde eine Versuchsanordnung gewählt, in der unter in vitro Bedingungen der physiologische Umsatz der Serumproteine annähernd nachvollzogen wurde. Als Protein wurde humanes Serumalbumin verwendet, das unter konstanten Bedingungen in Anwesenheit von Glucose inkubiert wurde (siehe C6.). Ein "Proteinturnover" wurde durch laufenden Ersatz einer definierten Probemenge durch frisches Albumin imitiert. Es wurde täglich  $1/20 (= 0,05 \text{ Vol.})$  ausgetauscht. Setzt man diesen Wert als Geschwindigkeitskonstante  $k$  für die Kinetik

1. Ordnung ein, so ergibt sich nach  $t/2 = 0,693/k$  eine Halbwertszeit von 13,8 Tagen. Somit kommt die gewählte Versuchsanordnung den in vivo Bedingungen mit einer mittleren Halbwertszeit von 2 bis 3 Wochen(42) recht nahe. Nach Abzug des zur Zeit Null bereits vorliegenden Fruktoselysins  $A_0$  ergibt sich eine durch den Nullpunkt verlaufende Kurve, wie sie in Fig. 8 dargestellt ist. Dies ist möglich, da die Glucosylierung linear verläuft, ganz gleich, ob das Albumin bereits in einem gewissen Umfang glucosyliert ist oder nicht(15,49). Es dauerte 40 Tage, bis sich ein Gleichgewicht zwischen der Entnahme von glucosylierten Proben und der Neuglucosylierung einstellte. Wie in Fig. 8 dargestellt ist, hängt das Ausmaß der Glucosylierung allein von der Höhe des Glucosespiegels ab. Als Grenzwert für einen postprandial gemessenen Glucosespiegel beim Nichtdiabetiker wurde eine Glucosekonzentration von 7,2mMol/l (= 130mg/dl) gewählt. Ein doppelt so hoher Glucosespiegel von 14,4mMol/l (= 260mg/dl) wurde als diabetischer Vergleichswert herangezogen. Wie Fig. 8 zeigt, ist die ermittelte Kinetik für den diabetischen und für den nichtdiabetischen Bereich gültig. Legt man den mittleren Normalwert für Glucosyl-Albumin bei Nichtdiabetikern von 3,9nMol Lysin-Glucose/mg Protein zugrunde (Tab. 1), so würde dies nach Extrapolation aus den Daten der Fig. 8 einer Glucosekonzentration von etwa 5mMol/l, d.h. dem üblichen durchschnittlichen Blutzuckerspiegel von Nichtdiabetikern entsprechen. Dies bedeutet aber gleichzeitig, daß die im vorliegenden Modellversuch vorgegebene Halbwertszeit für Albumin von 13,8 Tagen dem mit anderen Methoden in vivo bestimmten Wert von 14-21 Tagen am besten entspricht.

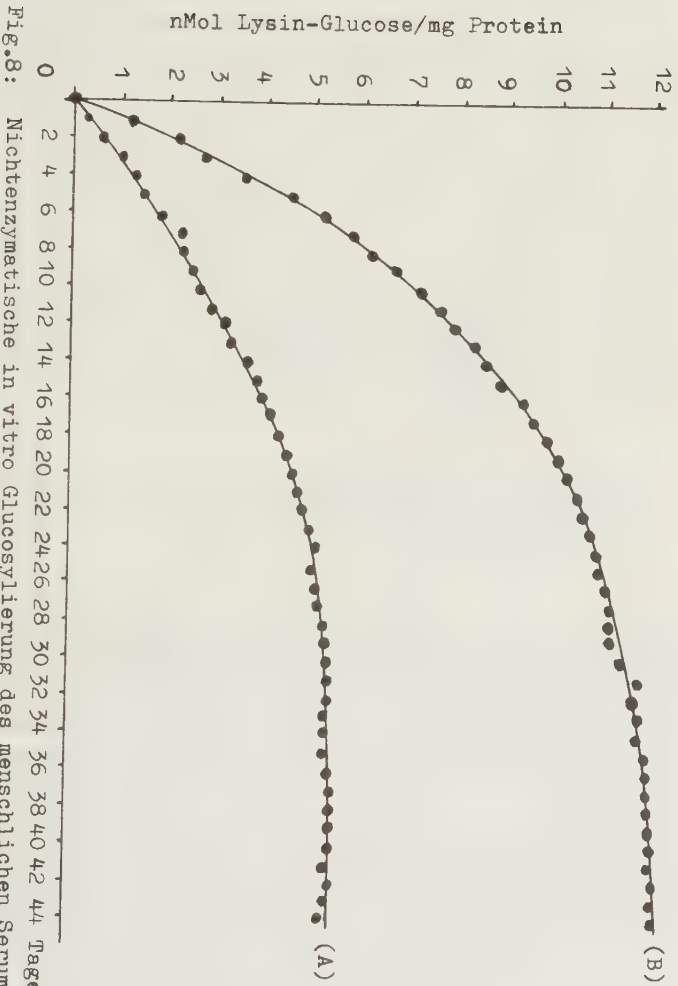


Fig. 8:

Nichtenzymatische in vitro Glucosylierung des menschlichen Serumalbumins unter steady-state-Bedingungen (temp. = 37°C; pH = 7,4;  $t_{1/2}$  = 14 Tage); Inkubation von Humanalalbumin (5g/dl) mit Glucose: (A) = 7,2mmol/l; (B) = 14,4mmol/l; Täglich wurde 1/20 der Inkubationslösung durch Originallösung ersetzt;

### 3.2. Gammaglobulin

Humanes  $\gamma$ -Globulin wurde in einer Lösung gleicher Zusammensetzung, wie für Albumin beschrieben, mit Glucose inkubiert, allerdings ohne Proteinaustausch. Die Glucosylierungsgeschwindigkeit erreichte bei einer Glucosekonzentration von 5,6mMol/l mit 0,17nMol Lysin-Glucose/mg Protein/die etwas mehr als ein drittel der Geschwindigkeit von Albumin mit 0,45nMol Lysin-Glucose/mg Protein/die (Verhältnis Albumin :  $\gamma$ -Globulin = 2,64 : 1,00). Dies entspricht etwa dem in Tab. 1 für das Nichtdiabetikerkollektiv ermittelten Verhältnis von 2,40 : 1,00 für glucosyliertes Albumin : glucosyliertem  $\gamma$ -Globulin. Dies bedeutet, daß bei gleichen Voraussetzungen in vivo und in vitro die Ergebnisse sich nicht unterscheiden.

### 4. Eliminierung von nichtenzymatisch glucosyliertem Humanalbumin aus dem Blutkreislauf (Selbstversuch)

In diesem Versuch wurden 1,1l einer hoch glucosylierten Humanalbuminlösung (34nMol/l Lysin-Glucose/mg Albumin) (siehe C)5.) i.v. in 40min infundiert. Zu den in Fig. 9 angegebenen Zeiten wurden Blutproben entnommen, und der Gehalt an glucosyliertem Serumprotein gemessen. Während des Versuchs stieg die Konzentration von Lysin-Glucose von 3,2nMol Lysin-Glucose/mg Protein auf 8,0nMol Lysin-Glucose/mg Protein an. Danach erfolgte ein zunächst rascher, später sich verlangsamerender Abfall an glucosyliertem Serumprotein. Abgeschlossen war die Abwanderung des glucosylierten Humanalbumins aus dem Blutstrom nach ca. 24h, wie aus Fig. 9 zu ersehen ist. Die weitere Abnahme nach 7 Tagen entspricht dem Abbau des glucosylierten Humanalbumins.

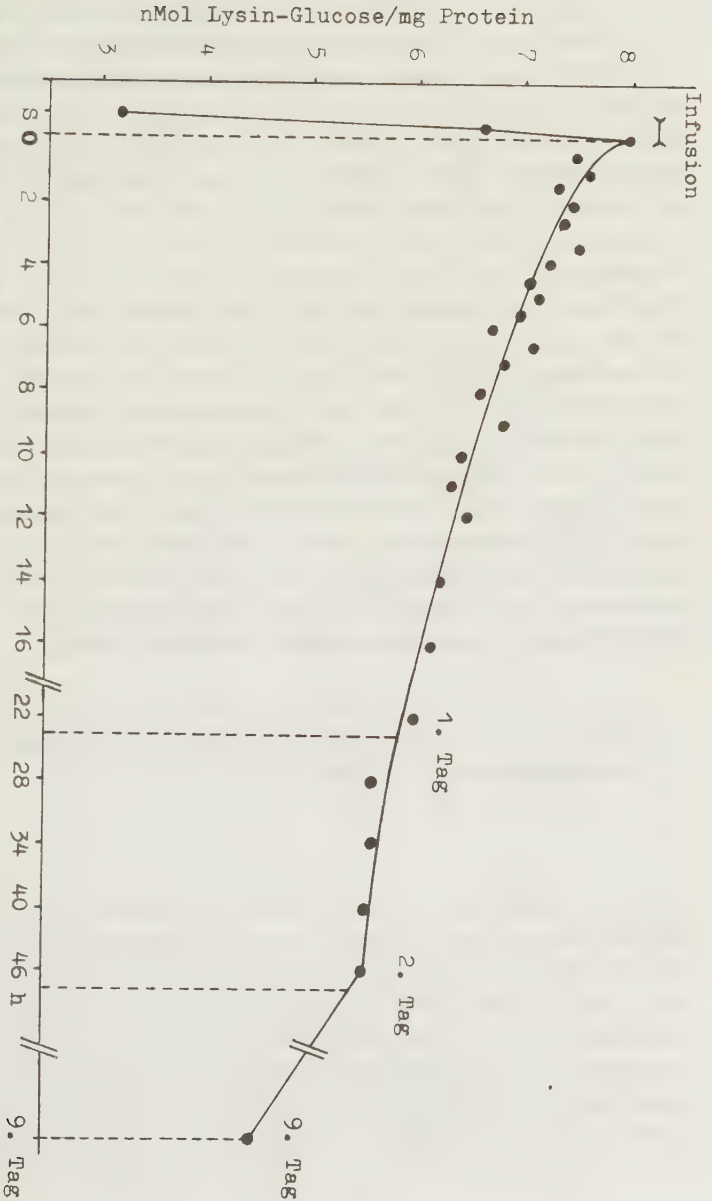


Fig. 9: Elimination des in vitro glucosylierten, menschlichen Humanalbumin aus dem Blutkreislauf; Infusion von 1,11 glucosyliertem Humanalbumin(5g/dl); S = Start;  
Glucosylierung des HA:  $34\text{nMol Lysin-Glucose/mg Albumin}$ ;

Ohne den zwischenzeitlichen Abbau zu berücksichtigen, ergibt sich durch Berechnung nach 48h eine Verteilung des infundierten Humanalbumins auf ein Körpervolumen von 12,3l, was in etwa dem in der Literatur angegebenen Extrazellulärvolumen von 15l entspricht(24). Nach Ablauf der Clearance tritt der Abbau des infundierten Humanalbumins in den Vordergrund, und zwar um  $0,15 \text{ nMol/mg Protein/die}$  vom dritten bis zum neunten Tag. Daraus und aus den übrigen Meßwerten läßt sich eine Halbwertszeit von ca. 8 Tagen für glucosyliertes Humanalbumin errechnen, ein Wert, der etwas unter dem in der Literatur für die Halbwertszeit des Albumin angegebenen Bereich von 10,5 - 20 Tagen liegt(42). Aus diesem Versuch läßt sich jedoch nicht entscheiden, ob das glucosylierte Humanalbumin schneller abgebaut wird, da die Kontrolle mit nicht glucosyliertem Humanalbumin nicht durchführbar war. Möglicherweise wird das gesamte Albumin auf Grund der Hyperalbuminämie schneller eliminiert, nachdem die Konzentration von Albumin im Serum mit  $4,80 \text{ g/dl}$  schon nach 9 Tagen ihren Ausgangswert erreicht hatte.

## 5. Vorkommen von freiem Fruktoselysin und kleinen basischen Glycosylpeptiden im Serum und Urin

### 5.1. Urin

Da nichtenzymatisch glucosylierte Aminosäuren im Körper offensichtlich nicht verstoffwechselt werden (6), und da sie gut wasserlöslich sind, ist zu vermuten, daß sie zum größten Teil über die Niere ausgeschieden werden. Es wurden deshalb Urinproben von Probanden mit und ohne Diabetes mellitus auf Fruktoselysin und auf kleine basische Glycosylpeptide hin untersucht. Wie in Fig. 10 gezeigt ist, scheiden Dia-

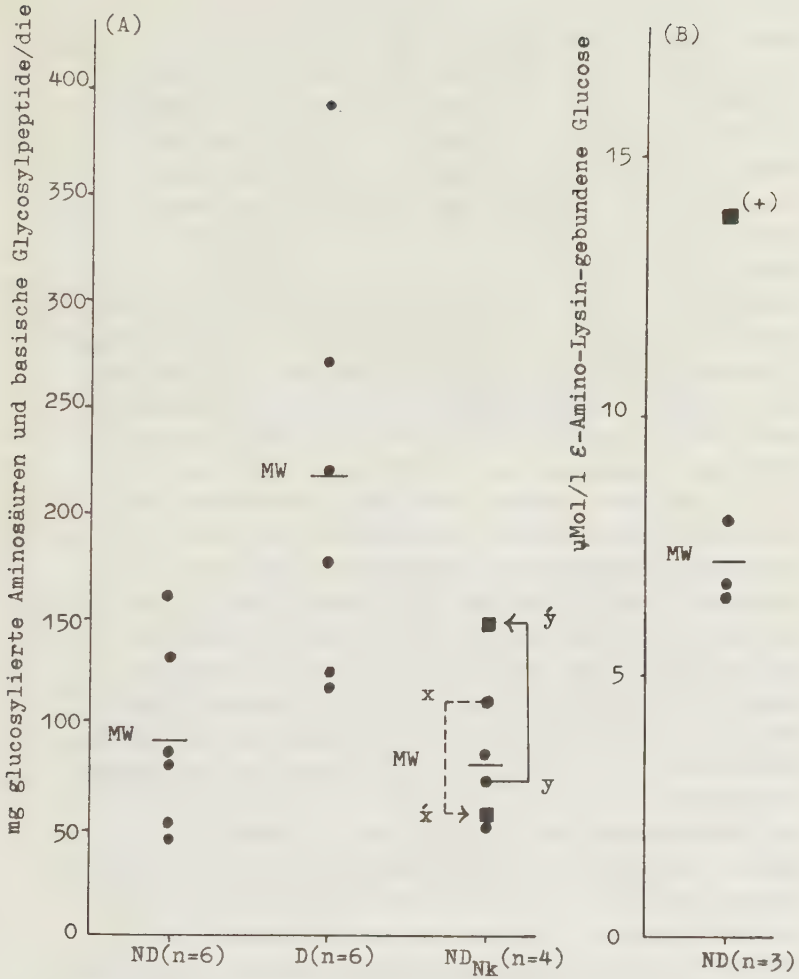


Fig. 10: Glucosylierte Aminosäuren und basische Glycosylpeptide im menschlichen Urin (A) und Fructose-lysine im menschlichen Blutplasma (B); MW=Mittelwert, ND=Nichtdiabetiker, D=Diabetiker, ND<sub>Nk</sub>=Nichtdiabetiker bei 24h Nahrungskarenz, (+)= Hungerdiät; •-->■ Änderung bei anabolem Stoffwechsel; •->■ Änderung nach 10-tägiger Nahrungskarenz;

betiker erheblich mehr an Fruktoselysin und basischen Glycosylpeptiden aus als Nichtdiabetiker. Mit einer durchschnittlichen Ausscheidung von 216,9mg/24h liegen Patienten mit Diabetes um mehr als die doppelte Menge über der Ausscheidung von Nichtdiabetikern mit 92,8mg/24h. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen früherer Untersucher (7) überein, die mit anderer Methodik gewonnen wurden.

Fraglich war noch, ob diese Verbindungen aus körpereigenen Vorstufen oder aus der Nahrung stammen. Eine intestinale Resorption von Fruktoselysin im Darm von Ratten gilt als gesichert(6), doch dürfte dies keine große Rolle spielen, da Fruktoselysin von der humanen Darmflora rasch abgebaut wird(45). Die Annahme, daß es sich um intracorporal gebildete Stoffwechselprodukte handelt, stützen Urinuntersuchungen nach 12-stündiger Nahrungskarenz während eines 24-stündigen nahrungsfreien Intervalls. Die Werte liegen mit einem Mittelwert von 80,8mg/24h (siehe Fig. 10A) nur unwesentlich unter dem der nichtdiabetischen Probandengruppe. Es ist ferner aus Fig. 10A zu ersehen, daß sich der diabetische und der nichtdiabetische Bereich überlappen. Dies kann durch die unterschiedlich schwere Entgleisung des Diabetes erklärt werden. So stieg die Ausscheidung von Fruktoselysin im katabolen Zustand, d.h. nach 12h Nahrungskarenz, von 72,9mg/24h auf 148,1mg/24h nach 10-tägiger Nahrungskarenz. Umgekehrt sank die Ausscheidung von glucosylierten Aminosäuren bei anaboler Stoffwechsellaage von 111,4mg/24h um 50% auf 56,4mg/24h, d.h. nachdem der Proband hochkalorisch, aber fruktoselysinfrei ernährt worden war. Die Diät bestand aus 800g Saccharose über 24h verteilt und zur Ergänzung des Aminosäuredefizits in der Infusion von 2500ml essentieller Aminosäuren (10g/dl) innerhalb von 24h. In Anbetracht der starken

Schwankungen in den Ausscheidungsmengen sind keine eindeutigen Aussagen über den Grad der diabetischen Stoffwechselstörung zu machen. Dagegen können anhand der ausgeschiedenen nichtenzymatisch glucosylierten Aminosäuren Rückschlüsse auf den Proteinaufbau und -abbau gezogen werden. Bei bedarfsgerechter Ernährung schwankt die Ausscheidung von glucosylierten Aminosäuren und basischen Glycosylpeptiden in engen Grenzen im Urin. Sie betragen im Durchschnitt 1,27mg pro kg Körpergewicht pro 24h mit Einzelwerten von 1,16mg, 1,19mg, 1,34mg und 1,37mg pro kg/24h. Im katabolen Zustand wurden anstelle von 1,16mg/24h 2,35mg/24h pro kg gemessen, im anabolen Zustand statt 1,34mg/24h 0,68mg/24h pro kg.

## 5.2. Serum

Die Stoffwechselsituation drückt sich auch in der Konzentration von freiem Fruktoselysin im Blutplasma aus. Ein Proband, dessen kataboler Zustand bekannt war, lag mit 13,9 $\mu$ Mol/l  $\epsilon$ -Amino-Lysin-gebundener Glucose weit über dem Durchschnitt von 7,2 $\mu$ Mol/l aus 3 Einzelwerten, wie in Figur 10B gezeigt ist.

## 5.3. Die Ausscheidung von Fruktoselysin über die Niere

Aus der Plasmakonzentration und der glomerulären Filtrationsrate (GRF, bestimmt als endogene Creatinin-clearance) wurde die primäre glomeruläre Filtration für Fruktoselysin berechnet. Laut Tab. 4 liegt dieselbe im Mittel bei 381,3mg/die und damit etwa viermal höher als die täglich im Urin ausgeschiedene Menge (siehe Fig. 10A). Dies bedeutet, daß ein großer

Teil des filtrierte Fruktoselysins - ähnlich wie die normalen Aminosäuren - in den Tubuli rückresorbiert wurde.

| Proband                   | Geschl. | GFR  | Plasma<br>Vol. in l | Fruchtoselysin |         |        |
|---------------------------|---------|------|---------------------|----------------|---------|--------|
|                           |         |      |                     | Plasma         |         | GFR    |
|                           |         |      |                     | µg/dl          | mg ges. | mg/24h |
| A <sup>+</sup>            | weibl.  | 1621 | 2,51                | 428,1          | 10,70   | 693,5  |
| B                         | weibl.  | 1621 | 2,51                | 206,4          | 5,16    | 334,4  |
| C                         | männl.  | 1801 | 2,81                | 203,3          | 5,69    | 365,9  |
| D                         | männl.  | 1801 | 3,01                | 246,4          | 7,39    | 443,5  |
| Mittelwerte aus B,C u. D: |         |      |                     | 218,7          | 6,08    | 381,3  |

Tab. 4: Gesamtmenge an freiem Fruktoselysin(= mg ges.)  
im Blutplasma mit Berechnung der täglichen  
glomerulären Filtration(=GRF);  
A<sup>+</sup> = kataboler Stoffwechselzustand;

Schließt man die Metabolisierung von Fruktoselysin aus, so läßt sich die aus dem Abbau von Albumin und Hämoglobin entstehende Menge an Fruktoselysin abschätzen. Für beide Proteine ist eine durchschnittliche Glucosylierung von 4nMol Lysin-Glucose/mg Protein anzunehmen(41). Die tägliche Neusynthese beider Proteine beträgt ca. 20g. Davon sind 12g Serumalbumin u. 8g Hämoglobin(27).

Mindestmenge an ausgeschiedenem Fruktoselysin(F1):

$$F1 = \frac{4nMol \text{ Lysin-Glucose} \times 308g \times 20g \text{ Protein}}{mg \text{ Protein} \times Mol \text{ Lysin-Glucose}} =$$

$$= 25mg/24h;$$

Die Ausscheidung an Fruktoselysin übertrifft damit die Ausscheidung an nicht glucosyliertem Lysin (0-16mg/24h)(43). Aus diesem Ergebnis ist zu folgern, daß alle übrigen im Körper in großen Mengen vorhandenen Proteine (Kollagen, Muskulatur etc.) einen pro Gewichtseinheit geringeren Beitrag in der Ausscheidung von glucosylierten Aminosäuren leisten, sei es auf Grund einer niedrigeren Abbaurate, sei es auf Grund einer niedrigen Glucosylierung.

## 6. Nichtenzymatische Glucosylierung von Serumproteinen und Langzeitüberwachung des Diabetes mellitus

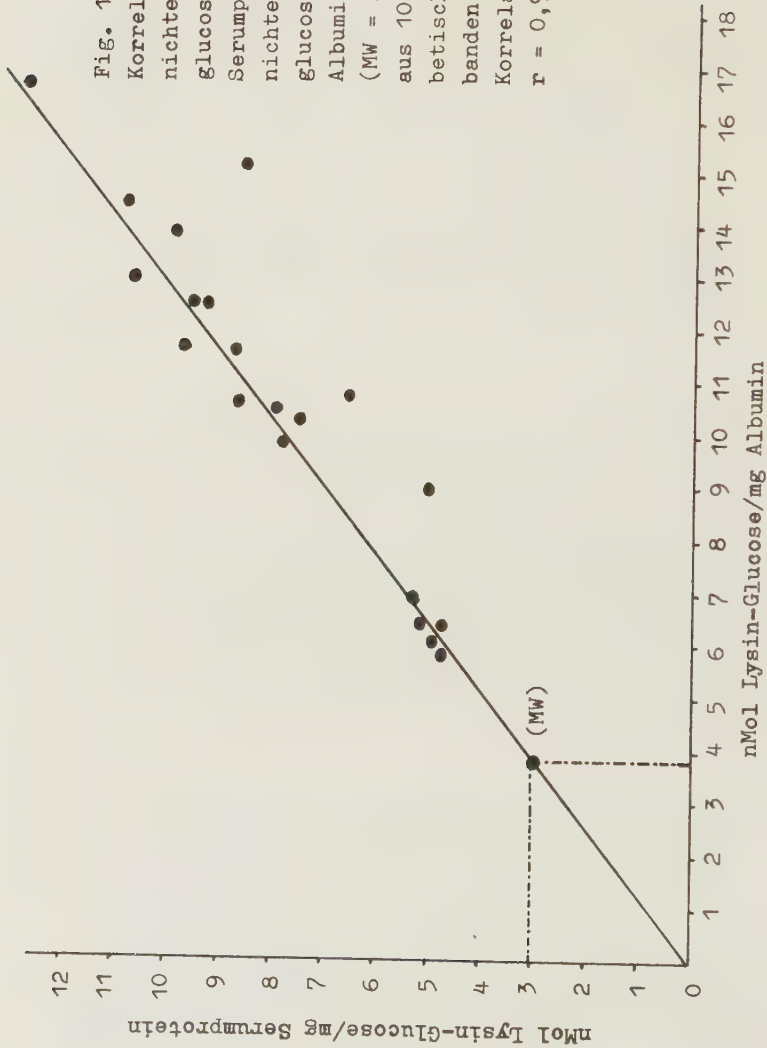
### 6.1. Vergleich von Serumprotein und Albumin

Wie Fig.11 zeigt, besteht eine gute Korrelation ( $r=0,93$ ) zwischen dem Fruktoselysingehalt von Albumin und dem des Gesamtserumproteins. Der Grund hierfür ist in der Tatsache zu suchen, daß 80% der im Serum gemessenen Fruktoselysinmenge aus der Albuminfraktion stammt, welche damit weitgehend den Glucosylierungsgrad des Serums bestimmt. Diese Beziehung gilt nicht, wenn der Anteil des Albumins am Gesamtserum pathologisch verändert ist.

### 6.2. Glucosyliertes Serumprotein als Parameter der längerfristigen Blutzuckerüberwachung bei Diabetikern

Die enge Korrelation von glucosyliertem Serumprotein und Albumin erlaubt es, den Glucosylierungsgrad des Gesamtserums zur Langzeitkontrolle des Blutzuckers von Diabetikern auszunutzen. Für die Bestimmung sind 100µl

Fig. 11:  
Korrelation von  
nichtenzymatisch  
glucosyliertem  
Serumprotein mit  
nichtenzymatisch  
glucosyliertem  
Albumin (n=20);  
(MW = Mittelwert  
aus 10 nichtdia-  
betischen Pro-  
banden);  
Korrelation:  
 $r = 0,93$ ;



Kapillarblut erforderlich. Die Auswertung erfolgt durch Vergleich mit dem Fruktoselysingehalt von nichtdiabetischen Seren mit bekanntem, mittlerem Blutzuckerwert. Auf diese Weise läßt sich eine mittlere Blutzuckerkonzentration abschätzen, indem man den durchschnittlichen, physiologischen Blutzuckerspiegel als Vergleichsparameter heranzieht.

Mittlere Blutzuckerkonzentration(MBZK) =

$$= \frac{\text{Serumglucosylierung in nMol Lys.-Gluc./mg Prot.} \times \frac{5,2\text{mMol/l Glucose}^{(+)} }{3,1\text{nMol Lys.-Gluc./mg Prot.}}}{1}$$

MBZK: Benennung in mMol/l;

(+): 5,2mMol/l Glucose = 93mg/dl; Der Wert wurde aus 10 Einzelwerten nichtdiabetischer Probanden errechnet;

Die Bestimmung des glucosylierten Serumproteins zeigt gegenüber der bekannten HbA<sub>1a-c</sub>-Bestimmung(17) den Vorteil, daß sie rascher auf Blutzuckerschwankungen reagiert. Die praktisch irreversible Bindung von Glucose an Lysin im Serumprotein ist dafür verantwortlich, daß erhöhte Blutzuckerwerte gespeichert und nachträglich noch festgestellt werden können. Erst mit der Elimination des betreffenden Serumproteins aus dem Blutplasma verschwindet auch die Lysin-gebundene Glucose, und mit ihr die gespeicherte Information. Zeigt die nichtenzymatische Glucosylierung eine Diabetesentgleisung an, so kann diese sowohl durch längerfristige, mäßige Blutzuckererhöhung bedingt sein als auch durch kürzere, hohe Blutzuckerspitzen. In Anbetracht der 2 bis 3-wöchigen Halbwertszeit von Albumin könnte eine Langzeitkontrolle alle 3-4 Wochen erfolgen, doch fehlen hierzu noch umfangreichere klinische Erfahrungen. Für noch kürzere Intervalle könnten

eventuell Blutproteine wie z.B. Fibrinogen( $t_{1/2} = 4$  Tage) geeignet sein, doch stehen entsprechende Untersuchungen noch aus.

### 6.3. Vergleich der nichtenzymatischen Glucosylierung des Serumproteins mit dem Blutzuckerspiegel

In Fig. 12 wurde der Grad der nichtenzymatischen Glucosylierung des Serumproteins von Diabetikern gegen den Mittelwert der Blutzuckerkonzentration, errechnet aus 5-30 Einzelwerten der vorangegangenen Tage, aufgetragen. Es zeigte sich, daß keine sehr enge Korrelation zwischen den beiden Parametern besteht. Die Ursache hierfür dürfte in den schwankenden Glucosespiegeln zu suchen sein, während es das Wesen der nichtenzymatischen Glucosylierung ist, diese Schwankungen im Sinne eines Integrals auszugleichen. Im Idealfall, d.h. beim Nichtdiabetiker, sollte sich der Blutglucosespiegel zum Glucosylierungswert proportional verhalten. Dies ist in Fig. 12 durch eine Linie dargestellt, die vom Nullpunkt durch den Schnittpunkt des mittleren Blutzuckerwertes(5,2mMol/dl) und des mittleren Glucose-Lysin-Gehaltes(3,10nMol Lys.-Gluc./mg Protein) eines Normalkollektivs(n=10) gezogen wurde. Es ist zu erwarten, daß alle Patienten, die einen stabilen Diabetes aufweisen, in enger Nachbarschaft zu dieser Orientierungskurve liegen. Die weite Streuung der übrigen Punkte in Fig. 12 bestätigt, daß der aktuell gemessene Blutzucker keine Aussage über die tatsächliche Stoffwechsellaage des Diabetes in den letzten Wochen gibt, wenn ihm auch für eventuell akute Maßnahmen die allein entscheidende Bedeutung zukommt. Patienten, deren Diabetes vor Einlieferung in die Klinik akut entgleist ist, liegen denn auch fernab der Orientierungskurve, da hier die nichten-

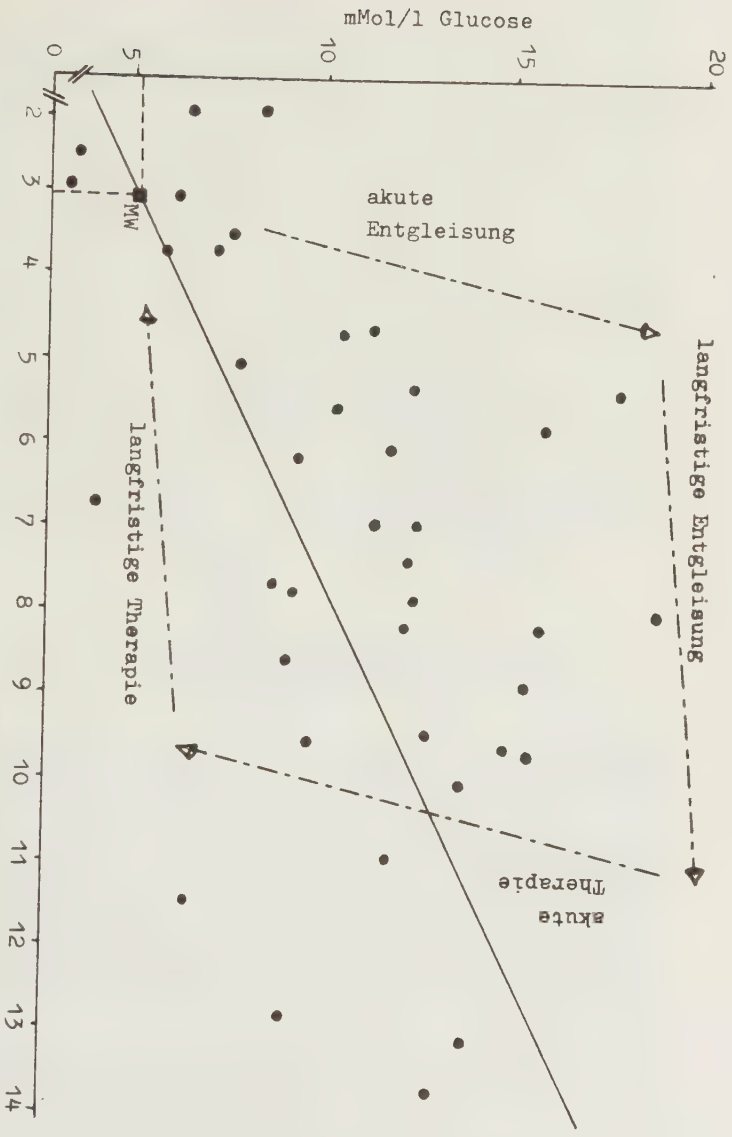


Fig. 12: Vergleich der nichtenzymatischen Glucosylierung des Serumproteins mit Mittelwerten(n=40) aus den aktuellen Blutzuckerspiegeln(je 5-30 Einzelwerte); Die Gerade stellt eine Orientierungshilfe dar, die durch den Ursprung und den Mittelwert des Normalkollektivs gelegt wurde. MW=Mittelwert, Gemessen aus Seren von 10 nichtdiabetischen Probanden;

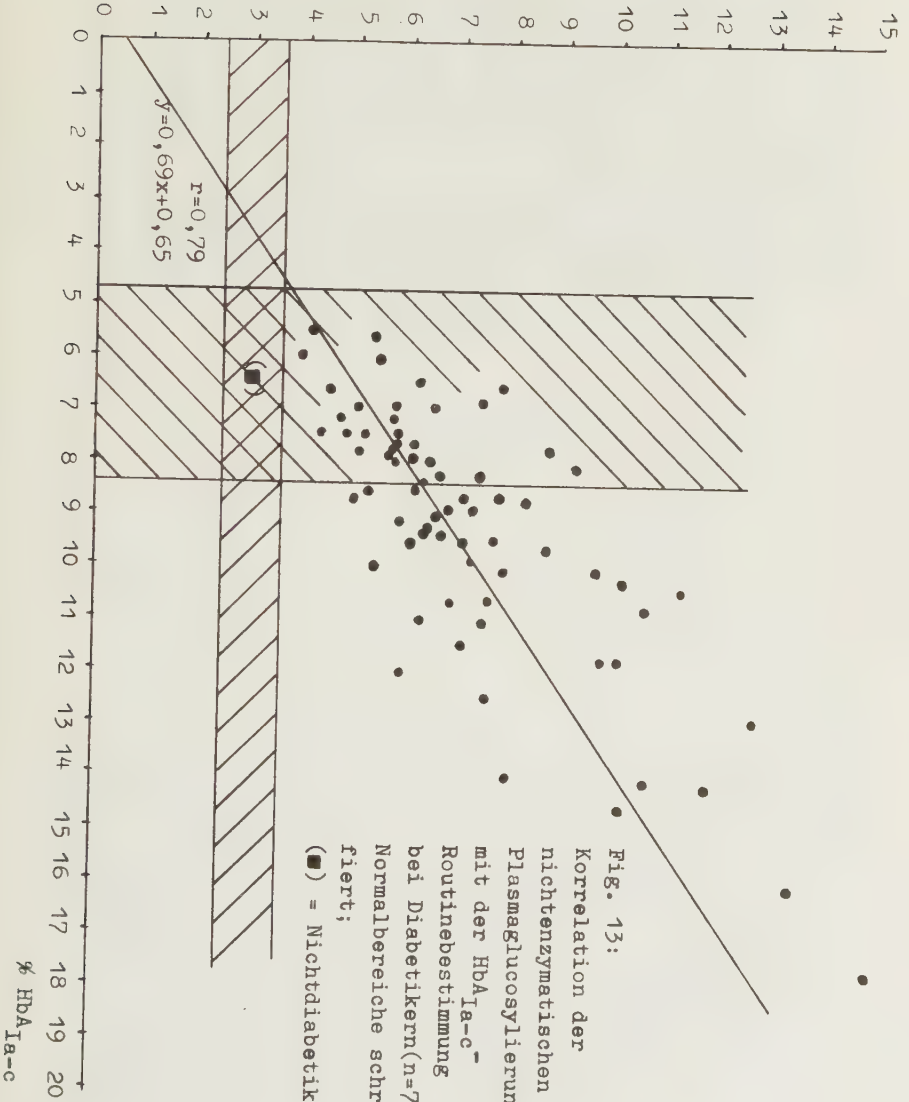
zymatische Glucosylierung den Zustand des steady-state auf höherem Niveau noch nicht erreicht hat. Stellt sich der Diabetes dagegen langsam auf höhere Blutzuckerwerte ein, dann nähert sich das Wertepaar aus Blutzuckerspiegel und nichtenzymatischer Glucosylierung der in Fig. 12 eingezeichneten Orientierungslinie. Den weiteren Verlauf bestimmt die Therapie, wo bei erwartungsgemäß der Blutzuckerspiegel rascher abfällt als der Lysin-gebundene Zucker. Erst wenn das gesamte Serumprotein erneuert ist, stellt sich auch der Gehalt an nichtenzymatisch gebundener Glucose auf ein niedrigeres Niveau ein. Dies ist in Fig. 12 in Form eines Zyklus veranschaulicht. Dieses Konzept ist rein theoretischer Natur und berücksichtigt nicht, daß sich die Glucosylierung stets aus glucoseabhängiger Neuglucosylierung und kontinuierlichem Serumprotein-austausch zusammensetzt.

#### 6.4. Vergleich von nichtenzymatisch glucosyliertem Serumprotein und Hämoglobin $\text{HbA}_{1a-c}$

Das bisher angewandte Routineverfahren, Diabetespatienten zu kontrollieren, ist die  $\text{HbA}_{1a-c}$ -Bestimmung (17). Sie erfaßt neben der Lysin-gebundenen Glucose die an das N-terminale Valin der  $\beta$ -Kette im Hämoglobin gebundene Glucose(4,8,13,34). Wegen seiner längeren Halbwertszeit von 60-90 Tagen spiegelt das  $\text{HbA}_{1a-c}$  den zurückliegenden, mittleren Blutzucker mit größerer Verzögerung wieder als Albumin bzw. Serumprotein.

Eine Gegenüberstellung der  $\text{HbA}_{1a-c}$ -Methode mit der nichtenzymatischen Glucosylierung des Gesamtserumproteins zeigt Fig. 13. Vergleicht man die Wertepaare miteinander, so weichen Patienten mit länger zurückliegender Entgleisung in Richtung eines erhöhten  $\text{HbA}_{1a-c}$ -Wertes ab, während weniger lang zurückliegende

nMol Lysin-Glucose/mg Protein



Entgleisungen in Richtung der nichtenzymatischen Glucosylierung des Serums abweichen. Der Normbereich ist in Fig. 13 für die  $\text{HbA}_{1a-c}$ -Methode mit 4,7-8,4% angegeben. Die nichtenzymatische Serumglucosylierung von Nichtdiabetikern schwankt zwischen 2,40 und 3,60 nMol Lysin-Glucose/mg Protein. Ein wesentlicher Vorteil der nichtenzymatischen Glucosylierung des Serumproteins für die Diagnostik ist, daß neben dem geringeren zeitlichen Aufwand für eine Bestimmung die nichtenzymatische Glucosylierung noch in hohen Bereichen diskriminiert, wo die  $\text{HbA}_{1a-c}$ -Methode die Grenzen ihrer Differenzierung erreicht hat (15% und mehr).

### E) Zusammenfassung

Für die Bestimmung der nichtenzymatischen Glucosylierung von Serumproteinen bewährte sich die Furosinsmethode nach Trennung durch HPLC. Für die tägliche Routine eignet sich die Fällung des Proteins mit Uranylacetat(0,16g/dl) mit anschließender Hydrolyse in 6N HCl für 1h bei 120°C. Es zeigte sich, daß die Fruk-toselysinrelation der einzelnen Proteinfractionen des Serums bei Nichtdiabetikern und Diabetikern nahezu identisch ist. Die Auswertung von zwei Kollektiven mit je 20 Stichproben ergab bei Nichtdiabetikern und Diabetikern folgende Mittelwerte für die nichtenzymatische Glucosylierung(Gl).

|                       | G <sup>l</sup> Nichtdiabetiker | G <sup>l</sup> Diabetiker |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Serum:                | 3,10                           | 8,03                      |
| Albumin:              | 3,89                           | 10,96                     |
| $\alpha_1$ -Fraktion: | 2,28                           | 6,68                      |
| $\alpha_2$ -Fraktion: | 1,72                           | 3,76                      |
| $\beta$ -Fraktion:    | 1,60                           | 3,47                      |
| $\gamma$ -Fraktion:   | 1,62                           | 3,59                      |

Gl: in nMol Lysin-Glucose/mg Protein;

Danach entfallen 80% des nichtenzymatisch glucosylierten Serumproteins auf Albumin. Allgemein gilt, daß hohe Proteinumsatzraten niedrige Glucosylierungswerte bedingen und umgekehrt. Geht Serumprotein über die Niere verloren, gibt die nichtenzymatische Glucosylierung des im Urin wiedergefundenen Proteins annähernd die Verhältnisse im Serum wieder. Liegt eine Synthesestörung in der Leber vor, hängt die Glucosylierung von der zeitlichen Präsenz des betreffenden Proteins im Blutplasma ab. Das gleiche gilt für Plasmozytome.

Die nichtenzymatische Glucosylierung hängt von vier Parametern ab. Davon sind die Temperatur, der pH-Wert und die Halbwertszeit des Proteins vorgegeben. Damit ist das Ausmaß der Glucosylierung allein von der variablen Blutglucosekonzentration abhängig. Für jedes Protein existiert eine eigene Glucosylierungsgeschwindigkeit, welche neben der Halbwertszeit des Proteins das Ausmaß der Glucosylierung bestimmt. Im in vitro Versuch dauerte es für die Glucosylierung von Albumin bei einer Halbwertszeit von 14 Tagen 40 Tage bis ein Gleichgewicht zwischen Glucosylierung und Elimination herzustellen war. In diesem Versuch stimmte die Höhe der nichtenzymatischen Glucosylierung mit den in vivo für die entsprechende Blutzuckerkonzentration gefundenen Ergebnissen überein.

Untersucht man das Verteilungsvolumen von hoch glucosyliertem Albumin, so zeigt sich, daß in vitro glucosyliertes Albumin nach Infusion beim Menschen in vivo annähernd dasselbe Verteilungsvolumen erreicht, welches dem in vivo glucosyliertem Albumin zugänglich ist. Für den Abbau von hoch glucosyliertem Albumin ergab sich bei nur einer untersuchten Stichprobe eine Halbwertszeit von ca. 8 Tagen. Sie lag damit etwas unter dem Normalbereich von 10,5 - 20 Tagen.

Die Ausscheidung nichtenzymatisch glucosylierter Aminosäuren erfolgt über die Nieren. Für Nichtdiabetiker (n=6) wurden zusammen mit basischen Glycosylpeptiden im Mittel 92,8mg/24h im Urin gemessen, für Diabetiker (n=6) mit 216,9mg/24h mehr als das doppelte. Entgegen der Erwartung war kaum eine Aufnahme von nichtenzymatisch glucosylierten Substanzen aus der Nahrung nachzuweisen. Bei kurzfristiger Nahrungskarenz wurden im Mittel für Nichtdiabetiker (n=4) mit 80,8mg/24h nur unerheblich weniger als bei Nahrungszufuhr im Urin gemessen. Die Ausscheidung hängt hier allerdings stark von der Stoffwechselsituation ab. Im kata-

bolen Zustand steigt die Ausscheidung an, im anabolen fällt sie ab. Ähnliches gilt für die Fruktoselysin-konzentration im Serum, wo im Mittel 7,2  $\mu$ l Fruktoselysin/1 Plasma (n=3) gemessen wurden. Diese Konzentration führt zu einer täglichen Filtrationsrate von 381,3 mg Fruktoselysin/die, wovon ca. 25% im Urin ausgeschieden werden.

Zwischen der nichtenzymatischen Glucosylierung des Serums und des Albumins besteht eine enge Korrelation. Diese Beziehung läßt sich für die Stoffwechselüberwachung eines Diabetes mellitus verwerten, indem man aus 50  $\mu$ l Serum im Routineverfahren die nichtenzymatische Glucosylierung von Serumprotein durch HPLC bestimmt. Die umständliche Reinigung des Albumins aus dem Serum wird dadurch überflüssig. Dieses Verfahren scheint geeignet zur Überwachung eines Diabetes mellitus im Abstand von ca. 4 Wochen. Neben der Untersuchung speziell klinischer Fragestellungen ergeben sich weitere Möglichkeiten zur Kontrolle von Diabetikern. Hier ist vor allem an die Stoffwechselüberwachung von diabetischen Schwangeren zu denken. Als Kontrollverfahren in der Einstellung von Insulinpumpen ist die nichtenzymatische Glucosylierung von Serumproteinen bereits in Erprobung.

Ein Vergleich zwischen dem aktuellen Blutzucker und der nichtenzymatischen Glucosylierung des Serumproteins zeigt, daß keine enge Korrelation besteht.

Gegenüber der HbA<sub>1a-c</sub>-Methode hat die nichtenzymatische Glucosylierung der Serumproteine den Vorteil, daß sie auf Grund der kürzeren Halbwertszeit der Serumproteine (Albumin:  $t_{1/2}$ =14 Tage) in kürzeren Abständen bei höherer Genauigkeit für die Kontrolle eingesetzt werden kann (Hämoglobin:  $t_{1/2}$ =60-90 Tage). Die nichtenzymatische Glucosylierung wäre damit eine Ergänzung dieses bereits üblichen Verfahrens, das für gut eingestellte Diabetiker geeignet ist und Kontrollen im vierteljährlichen Abstand erfordert.

# Literaturverzeichnis

- 1) Allen D.W., Schröder W.B. & Balog J. (1958),  
J. Am. Chem. Soc. 80, pp. 1628-1634;
- 2) Bailey A.J., Robins S.P., Tanner M.J.A., (1976),  
Biochim. Biophys. Acta, Vol. 434, pp. 51-57;
- 3) Behring Fa., In: Tabelle der Proteine des menschlichen Blutplasmas (1977),  
Behringwerke AG, Med. Inf. u. Vertrieb, F. a. M.;
- 4) Bookchin R.M., Gallop P.M. (1968),  
Biochem. Biophys. Res. Comm., Vol. 32/1, pp. 86-93;
- 5) Brandt A., Erbersdobler H. (1973),  
Landwirtsch. Forsch., Sonderh. 28/II;
- 6) Brandt A. (1978),  
Dissertation, Universität Göttingen;
- 7) Brownlee M., Vlassara H., Cerami A. (1980),  
Diabetes, Vol. 29, pp. 1044-1047;
- 8) Bunn H.F., Shapiro R., McMannus M., Garrick L.,  
McDonald M.J., Gallop P.M., Gabbay K.H. (1979),  
J. Biol. Chem., Vol. 254, pp. 3892-3898;
- 9) Chang A.Y., Noble R.E. (1980),  
Life Science, Vol. 26, pp. 1329-1333;
- 10) Day J.F., Thornburg R.W., Thorpe S.R.,  
Baynes J.W. (1979),  
J. Biol. Chem., Vol. 254, pp. 9394-9400;
- 11) Day J.F., Thorpe S.R., Baynes J.W. (1979),  
J. Biol. Chem., Vol. 254, pp. 595-597;
- 12) Dixon H.B.F. (1972),  
Biochem. J., Vol. 129, pp. 203-208;
- 13) Dolhofer R., Städele A., Wieland O.H. (1977),  
Klin. Wschr., Vol. 55, pp. 945-954;
- 14) Dolhofer R., Wieland O.H. (1979),  
Febs Letters, Vol. 100/1, pp. 133-136;
- 15) Dolhofer R., Wieland O.H. (1979),  
Febs Letters, Vol. 103, pp. 282-286;

- 16) Dolhofer R., Wieland O.H. (1980),  
Diabetes, Vol. 29, pp. 417-422;
- 17) Dolhofer R., Wieland O.H. (1980),  
Laboranweisung, Schwab. Krankenh. München;
- 18) Erbersdobler H. (1976),  
In: Protein Metabolism and Nutrition. Edited by  
D.J.A. Cole, K.N. Boorman, P.J. Buttery, D. Lewis,  
R.J. Neale, H. Swan, Butterworths, London-Boston;
- 19) Erbersdobler H. (1977),  
In: Protein Crosslinking. Edited by Mendel  
Friedman, Plenum Press, New York and London,  
pp. 367-378;
- 20) Finot P.A., Bricout J., Viani R. & Mauron J.  
(1968),  
Experientia 24, pp. 1097-1099;
- 21) Finot P.A. (1973),  
In: J.W.G. Porter, B.A. Rolls, "Protein Human  
Nutrition", Chapter 34, Academic Press,  
London-New York, p. 501;
- 22) Flückinger R., Winterhalter K.H. (1976),  
Febs Letters, Vol. 71/2, pp. 356-360;
- 23) Gabbay K., Sosenko J.M., Banuchi G.A.,  
Minichsohn M.J., Flückinger R. (1979),  
Diabetes, Vol. 28, pp. 337-340;
- 24) Ganong W.F. (1974),  
In: Lehrbuch der Medizinischen Physiologie,  
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York;
- 25) Gottschalk A. (1952),  
Biochem. J., Vol. 52, pp. 455-460;
- 26) Guthrow C.E., Morris M.A., Day J.F., Thorpe S.R.,  
Baynes J.W. (1979),  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 76,  
pp. 4258-4261;
- 27) Harper, Löffler, Petrides, Weiss (1975),  
Physiologische Chemie, Springer-Verlag,  
Berlin Heidelberg New York;

- 28) Heyns K., Heukeshoven J., Brose K.H. (1968),  
Angewandte Chemie, Vol. 15, p. 627;
- 29) Heyns K., Müller G., Paulsen H. (1967),  
Liebigs Ann. Chem., Vol. 703, pp. 202-214;
- 30) Hodge J.E. & Rist C.E. (1953),  
J. Am. Chem. Soc., Vol. 75, pp. 316-322;
- 31) Holmquist W.R. & Schröder W.A. (1966),  
Biochemistry, Vol. 5, pp. 2489-2504;
- 32) Keeney M., Basette R. (1959),  
J. Dairy Sci., Vol. 42, pp. 945-960;
- 33) Kennedy A.L., Mehl T.D., Merimee T.J. (1980),  
Diabetes, Vol. 29, pp. 413-415;
- 34) Koenig R.J., Blobstein S.H., Cerami A. (1977),  
J. Biol. Chem., Vol. 252, pp. 2992-2997;
- 35) Maillard L.C. (1912),  
Compt. Rend. Hebd. Séance Acad. Sci. 154, 66-68;
- 36) Miller J.A., Gravallesse E., Bunn H.F. (1980),  
J. Clin. Invest., Vol. 65, pp. 896-901;
- 37) Rahbar S. (1968),  
Clin. Chim. Acta 22, pp. 296-298;
- 38) Rosenberg H., Mondrak J.B., Hassing J.M.,  
Al-Turk W.A., Stohs S.J. (1979),  
Biochem. Biophys. Res. Comm., Vol. 91,  
pp. 498-501;
- 39) Schleicher E., Deufel T., Wieland O.H. (1981),  
Febs Letters, Vol. 129, pp. 1-4;
- 40) Schleicher E., Wieland O.H. (1981),  
J. Clin. Chem. Clin. Biochem., Vol. 19, pp. 81-87;
- 41) Schleicher E., unveröffentlicht,  
Forschergruppe Diabetes, Schwab. Krankenh. M.;
- 42) Schultze H.E., Heremans J.F. (1966),  
In: Molecular Biology of Human Proteins,  
Amsterdam, New York, Elsevier/North-Holland  
Vol. 1, p. 475;
- 43) Sitzmann F.C. (1976),  
Normalwerte, Hans Marseille Verlag, München;

- 44) Schnider S.L., Kohn R.R. (1980),  
J. Clin. Invest., Vol. 66, pp. 1179-1181;
- 45) Schreuder (1982),  
Diplomarbeit, Universität Groningen;
- 46) Stevens V.J., Rouzer C.A., Monnier V.M. &  
Cerami A. (1978),  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 75,  
pp. 2918-2922;
- 47) Tanzer M.L., Fairweather R., Gallop P.M. (1972),  
Arch. Biochem. Biophys., Vol. 151, pp. 137-141;
- 48) Trüeb B., Hohenstein C.G., Fischer R.W.,  
Winterhalter K.H. (1980),  
J. Biol. Chem., Vol. 255, pp. 6717-6720;
- 49) Wieland O.H., Dolhofer R., Schleicher E. (1980),  
Proc. 10th Congr. Intern. Diabetes Fed.  
(W.K. Waldhäusl, ed.), Excerpta Medica,  
Amsterdam, pp. 721-727;
- 50) Yue D.K., Morris K., McLennan S., Turtle J.R.  
(1980),  
Diabetes, Vol. 29, pp. 296-300;



Die hier vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 1980 bis Juli 1983 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. O.H. Wieland. Ihm gebührt mein Dank, da er es war, der mich an eine Aufgabe her= anführte, die für mich reizvoll war, meinen Ehr= geiz herausforderte und so von Erfolg gekrönt war. Seine kritischen Anmerkungen bei der Fertigstellung meiner Arbeit waren für mich ein schätzenswerter Gewinn in der Formulierung wissenschaftlicher Sach= verhalte.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinem Betreuer, Herrn Dr. E. Schleicher, für die stets fruchtbare Zusammenarbeit bedanken. Ihm gelang es, mir neue Anregungen zu geben, die mich motivierten, weiter in sein Forschungsgebiet einzudringen, was letztlich die Gesamtkonzeption dieser Arbeit wesent= lich beeinflusste.

Allen Mitarbeitern der Forschergruppe Diabetes danke ich für die gute Zusammenarbeit, für anregende Dis= kussionen und praktische Hilfen bei der Arbeit.

München, Juli 1983

*Erich Reinold*

## Lebenslauf

Erich Reindl

Geboren am 10. Mai 1954 in Mallersdorf

Eltern:        Josef Reindl  
              Franziska Reindl, geb. Wohlschläger

1960 - 66     Volksschule Prinkofen

1966 - 75     Hans-Leinberger-Gymnasium, Landshut

  Mai 1975     Abitur

1975 - 76     Wehrdienst

1977 - 83     Studium der Medizin an der Universität  
              München

Juni 1983     Approbation als Arzt

1980 - 83     Doktorarbeit am Diabetes-Forschungs=  
              institut im Schwabinger Krankenhaus,  
              München unter Anleitung von  
              Herrn Prof. Dr. O.H. Wieland







